

**Zeitaufgelöste Zweiphotonenlasermikroskopie zur in-vivo-Charakterisierung von
Zellparametern und endogener NAD(P)H-Fluoreszenz**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Bülent Peker

aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. K.-H. Gericke
2. Referent: Prof. Dr. P. J. Walla
eingereicht am: 31.07.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.10.2006
Druckjahr: 2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Raluca Niesner, Bülent Peker, Peter Schlüsche, and Karl-Heinz Gericke,
Noniterative Biexponential Fluorescence Lifetime Imaging in the Investigation of Cellular Metabolism by Means of NAD(P)H Autofluorescence,
Chemphyschem. 2004;5(8):1141-9.

R. Niesner, B. Peker, P. Schlüsche, K.-H. Gericke, C. Hoffmann, D. Hahne, C.C. Müller-Goymann
3D-resolved investigation of the *pH*-gradient in artificial skin constructs by means of fluorescence lifetime imaging
Pharm Res. 2005 ;22(7), 1079-87. Epub 2005 Jul 22.

Tagungsbeiträge

R. Niesner, B. Peker, K.-H. Gericke, C.C. Mueller-Goymann (2004)
3D-RESOLVED pH-MEASUREMENTS IN ARTIFICIAL SKIN CONSTRUCTS BY
MEANS OF FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING
International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology,
15.- 18. März 2004 Nürnberg, Deutschland

B. Peker, R. Niesner, K.-H. Gericke (2004)

Multiexponentielles Dynamisches τ -Mapping in der 2-Photonenmikroskopie

68. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, 22.-26. März 2004, München, Deutschland

R. Niesner; B. Peker; K.-H. Gericke

Subzelluläre 3D-Analyse von künstlichen Hautkonstrukten durch Visualisierung von Fluoreszenzlebensdauern

103. Tagung der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie,
20 - 22 Mai 2004, Dresden, Deutschland

B. Peker, R. Niesner, K.-H. Gericke (2005)

NAD(P)H autofluorescence - an approach to cellular metabolism

69. Jahrestagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, 04.-09. März 2005, Berlin, Deutschland

Stefan Quentmeier, Raluca Niesner, Bülent Peker, K.-H. Gericke (2005)

Subcellular parameter probing using TPM based FLIM

69. Jahrestagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, 04.-09. März 2005, Berlin, Deutschland

Raluca Niesner, Bülent Peker, Stefan Quentmeier, Karl-Heinz Gericke (2005)

Photophysics of Single-Molecule Detection by Two-Photon Excitation Considering Pulsed Illumination

104. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie, 05. – 07. Mai 2005, Frankfurt am Main, Deutschland

Stefan Denicke, Raluca Niesner, Bülent Peker, Ingo Rustenbeck and Karl-Heinz Gericke (2006)

Noniterative Biexponential Fluorescence Lifetime Imaging of NAD(P)H in MIN6-cells
The international MICROSCIENCE 2006 Exhibition and Conference,
27 - 29 June 2006 at ExCeL in London

Stefan Quentmeier, S. Denicke, Raluca Niesner, Bülent Peker, Karl-Heinz Gericke (2006)

Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging of Calcium in MIN6-cells
The international MICROSCIENCE 2006 Exhibition and Conference,
27 - 29 June 2006 at ExCeL in London

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	VORWORT	1
1.2	STAND DER FORSCHUNG	2
1.3	ZIELSETZUNG UND ÜBERBLICK	4
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	7
2.1	LINEARE UND NICHTLINEARE OPTIK.....	7
2.1.1	<i>Brechung</i>	<i>9</i>
2.1.2	<i>Effekte der nichtlinearen Optik</i>	<i>10</i>
2.2	DER LASER.....	11
2.2.1	<i>Der Titan-Saphir-Laser.....</i>	<i>12</i>
2.3	ZWEIPHOTONENANREGUNG.....	14
2.3.1	<i>Zwei- und Mehrphotonenprozesse</i>	<i>15</i>
2.3.2	<i>Auswahlregeln.....</i>	<i>18</i>
2.4	FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE	21
2.4.1	<i>Fluoreszenzlebensdauer</i>	<i>23</i>
2.4.2	<i>Fluoreszenzfarbstoffe</i>	<i>27</i>
3	MATERIALEN UND METHODEN	31
3.1	PRINZIP DES EXPERIMENTS.....	31
3.2	RENDERN VON FLUORESZENZLEBENSDAUERBILDERN (FLIM).....	37
3.3	DAS TRIMSCOPE	38
3.4	BIOLOGISCHE PROBEN	40
3.4.1	<i>MIN6 β-Zellen.....</i>	<i>41</i>
3.4.2	<i>Umströmungskammer für die MIN6 Zellstimulierung</i>	<i>43</i>
3.4.3	<i>3D-Hautkonstrukte.....</i>	<i>44</i>
4	IMAGINGTECHNIKEN.....	47
4.1	INTENSITY-COUNTING UND MAPPING	48
4.2	PARAMETER-MAPPING	49
4.3	3-D IMAGING.....	51
5	DERMALE PH-MESSUNGEN	57

5.1	BCECF ALS PH-SENSOR	58
5.2	DIE BRECHUNGSINDEXKORREKTUR	60
5.3	ANWENDUNG IN 3D-HAUTKONSTRUKTEN	62
6	ENERGIESTOFFWECHSEL VON ZELLEN	66
6.1	ENERGIESTOFFWECHSELMESSUNGEN ÜBER NAD(P)H-FLUORESZENZ.....	67
6.2	HOCHSENSITIVES INTENSITÄTSIMAGING MIT HOHER ZEITAUFLÖSUNG.....	73
6.3	ENERGIESTOFFWECHSEL DER INSULINPRODUZIERENDEN MIN6 β -ZELLEN	77
7	ZWEI-FARBEN ZWEI-PHOTONEN FREQUENZMISCHUNG MIT FEMTOSEKUNDENLASERPULSEN	86
7.1	DIE 2C2P ANREGUNG	87
7.2	APPARATIVE REALISIERUNG	89
7.3	ERGEBNISSE	91
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	93
	ANHANG	95
A.1	TIEFENSCAN DURCH EINE MIN-6 β -ZELLE	95
A.2	PYTHON-PROGRAMM FÜR DIE BIEXPONENTIELLE AUSWERTUNG.....	97
A.3	INTENSITÄTSBILDER FÜR EINE FLIM-AUSWERTUNG	100
	DANKSAGUNG:.....	101
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS:	102
	LITERATURVERZEICHNIS	107

Abkürzungen

2C2P	two-color two-photon
ATP	Adenosintriphosphat
BBO	Beta Barium Borat (β -BaB ₂ O ₄)
BCECF	Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
CCD	charge coupled device
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
cw	continuous wave
DASPI	2-(p-Dimethylaminostyryl)-pyridylmethyliodide
DBT8	Dibenzothiophen-Chromophor ¹
EPA	Einphotonenanregung
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FFM	Fluoreszenz-Fluktuations-Mikroskopie
FLIM	Fluorescencelifetime Imaging
FRET	fluorescence (oder Förster) resonance energy transfer
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HDF	humane dermale Fibroblasten
MCP	multi (bzw. micro) channel plate
MIN	mouse insulinoma
NA	numerische Apertur
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
PMT	Photomultiplier
SHG	second harmonic generation
UV	ultraviolett
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat (Y ₃ Al ₅ O ₁₂)
ZPA	Zweiphotonenanregung
ZPM	Zweiphotonen-(Fluoreszenz-)Mikroskopie

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Chemiker sind Naturwissenschaftler, die sich mit Chemie befassen. Die Frage, was man denn damit später machen kann, kennt jeder Chemiker in der Ausbildung bzw. im Studium. Jedoch ist die Lehre vom Aufbau, Verhalten und der Umwandlung der chemischen Elemente zumeist ein beziehungsreicher Einstieg für den naturwissenschaftlich Interessierten. Die Entwicklung der Biologie z.B. von einer beschreibenden hin zu einer aufklärenden Wissenschaft von Ursache und Wirkung der Welt des Lebendigen erforderte und erfordert eine immer engere Verknüpfung mit den Grundlagenfächern der Chemie und Physik. Gerade in der heutigen Zeit, kann die Chemie kaum noch als isoliertes Fachgebiet angesehen werden. Zu groß ist die Verknüpfung mit allen modernen Industriezweigen und Forschungsgebieten, in der sich der Chemie ganz individuelle Aufgaben stellen.

Die vorliegende Arbeit entstand in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie und der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF, jetzt Helmholtz Institut für Infektionsforschung HZI) in Braunschweig.

Der Beitrag eines Physiko-Chemikers zur Untersuchung biologischer Aspekte kann mannigfaltig sein. Das Verständnis der kleinsten, lebenden Untereinheit, der biologischen Zelle, beginnt naturgemäß bei den „Biomolekülen“. Wobei der Begriff Biomoleküle allgemein alle Moleküle meinen kann, die an biologischen Regelkreisen beteiligt sind, wie z.B. Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate etc. Ein möglicher Beitrag wäre hier die Erforschung der physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Entwicklung einer Methode zur Beobachtung des Verhaltens dieser Biomoleküle.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit solch einer Methode, der Zweiphotonen-Lasermikroskopie, einer speziellen Mikroskopieart, die sich eines gepulsten Lasers bedient, um Objektstrukturen und molekulare Eigenschaften zu erforschen. Dabei werden diese Informationen durch unterschiedliche Fluoreszenz erhalten, welche von den Biomolekülen selbst oder durch eingebrachte Farbstoffe (sog. Fluorophore) herrühren können. Die Zweiphotonen-Fluoreszenz-Mikroskopie ist eine der wichtigsten Erfindungen der letzten Jahre für die bildgebende Biologie. Diese Technologie ermöglicht die dreidimensionale Untersuchung von biologischen Pro-

ben im Submikrometerbereich. Es können nicht nur Zellen oder Zellverbände als Ganzes, sondern auch lebende Organe nicht- oder minimalinvasiv erforscht werden. Bei der Zweiphotonenanregung (ZPA), welche das zu Grunde legende Phänomen bei dieser Mikroskopieart ist, werden zwei Photonen niedriger Energie simultan durch ein (Bio-)Molekül absorbiert und es wird nur ein Photon höherer Energie als Fluoreszenzlicht emittiert. Dieser Prozess beinhaltet einige besondere Vorteile, wie z.B. geringe Phototoxizität und große Eindringtiefe. Trotz großer Fortschritte ist man jedoch von dem Wunschziel einer molekular erklärbaren Biologie weit entfernt. Immer wieder ist man von der Komplexität biologischer Systeme überwältigt und gezwungen, sich zunächst auf die Analyse der makroskopischen Aspekte zu begrenzen.² Zellen als kleinste lebende Untereinheiten eines Organismus können mit der heutigen Durchlichtmikroskopie gut beobachtet werden. Sie stellen, zusammen mit ihren Organellen, die kleinste erkennbare strukturelle Einheit dar. Gleichzeitig sind sie für sich eine funktionelle Einheit und haben einen eigenen Stoffwechsel (sowohl Baustoffwechsel als auch Energiestoffwechsel).

1.2 Stand der Forschung

Wenn es um die Erforschung biologischer Systeme geht, stehen bedingt durch ihren nichtinvasiven Charakter sehr oft optische Messmethoden im Vordergrund. Die technischen Möglichkeiten sind hier sehr breit gefächert, so dass nur ein grober Überblick gegeben werden kann. Dies fängt bei der einfachen Durchlichtmikroskopie an und geht bis hin zur optischen Rasternahfeldmikroskopie welche die Auflösungsgrenze des optischen Mikroskops umgeht, indem nur Licht ausgewertet wird, das zwischen einer Nahfeldsonde und der Probe ausgetauscht wird. Letzteres erlaubt nur eine oberflächliche Untersuchung und ersteres funktioniert nur bis zu einer bestimmten Probendicke. Für die Mikroskopie an ganzen biologischen Gewebestücken müsste diese in feine Schnitte zerlegt werden, womit der nichtinvasive Charakter hinfällig wäre. Zwar gibt es viele Varianten der Durchlichtmikroskopie, wo die Kontrastverfahren optimiert wurden, aber die Einschränkungen bleiben die Gleichen. Jede Variante hat ihre Vor- und Nachteile und kommt somit anwendungsspezifisch zum Einsatz. Bei der Nahfeldmikroskopie (auch SNOM: scanning nearfield optical microscope) können zwar im Gegensatz zur Rastertunnelmikroskopie auch nicht elektrisch leitende Proben untersucht werden, was bei biologischen Proben naturgemäß der Fall ist, und man erreicht die höchstmögliche Auflösung, aber auch hier ist man auf die oberflächliche Untersuchung begrenzt. Zudem

gestaltet sich die Auswertung der erhaltenen Daten eher als schwierig, da das Auftreten von Artefakten nicht selten vorkommt.

Demgegenüber stehen fluoreszenzmikroskopische Techniken, die in den Biowissenschaften einen großen Boom erlebt haben und erleben. Auf Fluoreszenz basierende Messmethoden nutzen das Eigenleuchten (man spricht von Autofluoreszenz) von Biomolekülen oder die Fluoreszenz von Farbstoffen aus, um Informationen aus der Probe zu erhalten. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch geeignete Lichteinstrahlung angeregt. Die Verfolgung dieser Fluoreszenz innerhalb biologischer Systeme, die sich in einem Fließgleichgewicht befinden, erlaubt neue Sichtweisen in diese Transportprozesse. Auch können an große Biomoleküle fluoreszierende Komponenten gekoppelt werden, die dann als sensitiver Marker für diese fungieren. Gewisse Fluoreszenzfarbstoffkombinationen können ein sog. *fluorescence (oder Förster) resonance energy transfer* (FRET) durchführen, in dem der eine Farbstoff (Akzeptor) durch die Fluoreszenz des anderen Farbstoffs (Donor) selbst zur Fluoreszenz angeregt wird. Dies geschieht wenn sich die Moleküle sehr nahe kommen und kann deswegen in der Biochemie und der Zellbiologie zu Abstandsmessungen im Nanometerbereich genutzt werden. Die relativ große Trennung zwischen Anregungs- und Detektionswellenlänge ist hier von Vorteil, aber die verhältnismäßig geringe Anzahl an kombinierbaren Molekülen, und das aufwendige Verfahren lassen nach geeigneteren Methoden suchen. Die Fluoreszenzspektroskopie fasst allgemein alle Messtechniken zusammen, die die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe ausnutzen, um Informationen über die untersuchten Systeme zu gewinnen. Die Fluoreszenz-Fluktuations-Mikroskopie (FFM) beruht auf der Analyse fluktuierender Fluoreszenzsignale. Emittiertes Licht aus einem kleinen Beobachtungsvolumen wird hierbei auf einen empfindlichen Detektor abgebildet. Bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen und hinreichend kleinem Volumen können aus der Varianz der Signalfunktion die mittlere Aufenthaltsdauer und die Partikelzahl als typische Größen ermittelt werden.^{3, 4} Typischerweise werden mit FFM-Techniken kleine Volumen in Proben untersucht. Um Informationen über eine größere Fläche zu erhalten, wurden die so genannten Fluoreszenz-Imaging-Techniken entwickelt. Hier werden viele benachbarte, fluoreszierende, kleine Beobachtungsvolumen zu einem ganzen Bild zusammengesetzt und erlauben so in guter Auflösung eine bildgebende Mikroskopie. Dabei können die Fluoreszenzsignale vielfältig interpretiert werden, da die Farbstoffe unmittelbar durch Ihre Umgebung beeinflusst werden. Diesen Einfluss kann man charakterisieren und detaillierte Informationen aus dem System ziehen.^{5, 6, 7} Das Anregen der Farbstoffe geschieht in den meisten Fällen mit einem Laser. Moderne Laser mit ultrakurzen Pulsen erlauben die

Erforschung von schnell ablaufenden Prozessen in Natur und Technik. In Verbindung mit der Mikroskopie spricht man von einer Mikroskopie hoher zeitlicher Auflösung. Im Femtosekundenbereich (10^{-15} s) gibt es hierfür keine Alternativen, da die elektrische Messtechnik auf die Pikosekundenebene (10^{-12} s) und längere Zeiten begrenzt ist. Femtosekundenpulse sind insbesondere für so genannte Zweiphotonenanregungen (ZPA) von Interesse. Hier wird der Farbstoff mit zwei Photonen zur Fluoreszenz angeregt und emittiert dann bei der halben Anregungswellenlänge. In Verbindung mit der Mikroskopie spricht man von der Zweiphotonen-Fluoreszenz-Mikroskopie (ZPM). Die ZPM findet das erste Mal 1990 durch DENK et al.⁸ Erwähnung. Bis dato gab es viele Veröffentlichungen, die sich dem Thema ZPM gewidmet haben, allen voran die Arbeitsgruppen um DENK, GRATTON, WEBB, LAKOWICZ, PISTON und BIRGE. Viele weitere gab es, die die Leistungsfähigkeit der ZPM, was die örtliche und zeitliche Auflösung^{9, 10, 11} betrifft, verbessert und zum anderen biologisch relevante Fragen wie unter anderem Detektion von DNA-Fragmenten¹², Zellmembraneigenschaften¹³ oder Ca^{2+} -Konzentrationen in Zellen¹⁴ erörtern. Die ZPM findet eine immer schneller anwachsende Anzahl an Anwendungen in den Biowissenschaften, und wird immer noch weiterentwickelt. Dabei können verschiedene Gerätemodifikationen auf bestimmte Anwendungen angepasst werden und selbst Firmen, wie Olympus oder Zeiss, bieten mittlerweile fertige Zweiphotonen-Mikroskope (Tischgeräte) an. Eine bemerkenswerte Aufnahmetechnik stellt das *fluorescence lifetime imaging* (FLIM) dar. Das Imaging, welches die Fluoreszenzlebensdauer in jedem Punkt wiedergibt, wurde 1992 von LAKOWICZ et al. präsentiert.¹⁵ Hier wird die gute örtliche Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie mit einer hohen zeitlichen Auflösung verbunden und gibt Aufschluss über die jeweilige Fluoreszenzlebensdauer der jeweiligen Spezies. Das FLIM wird heutzutage weitgehend in der Medizin und in der Zellbiologie eingesetzt, unter anderen um FRET in Proteinen und Enzymen^{15, 16} zu untersuchen, Kationkonzentrationen (Ca^{2+}) dynamisch zu bestimmen¹⁷ und mikroskopische pH-Messungen durchzuführen.¹⁸

1.3 Zielsetzung und Überblick

Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung von Methoden und Anwendungen für die Zweiphotonen-Rasterlasermikroskopie für spezielle biologische Fragestellungen. Der Aufbau des Systems zu einem Fluoreszenzrastermikroskop geschah während meiner Diplomarbeit¹⁹, erste zwei- und dreidimensionale Fluoreszenzbilder von biologischen Proben konnten hier erzeugt werden. Durch Variation von optischen Bauelementen und Aufnahmemethoden wuchs das

Potential des Gerätes. Die Implementierung einer auf diesem Gebiet neuen nichtiterativen biexponentiellen Auswertemethode spielt hierbei eine wichtige Rolle und eröffnet neue Möglichkeiten auf dem Imaginggebiet der Zweiphotonenmikroskopie.²⁰

FLIM-Messungen an gezüchteten 3D-Hautkonstrukten sollen Aufschluss auf den Säurecharakter dieser Hautäquivalente geben und einen Vergleich in Bezug auf den pH-Wert erlauben. Dies ist mit speziellen Fluorophoren, die sensitiv auf den pH-Wert reagieren, geplant. Ferner sollen die Wirkungen auf den Energiestoffwechsel der insulinproduzierenden β -Zellen (bzw. B-Zellen) erforscht werden. An dem Energiestoffwechsel der Zelle sind unter anderem die Coenzyme NADH und NADPH beteiligt. Sie gehören zu den Pyridinnukleotid-Coenzymen, welche an zahlreichen biologischen Redoxprozessen beteiligt sind. So fungieren diese nicotinamidhaltigen Coenzyme in oxidierten Form als Elektronenakzeptoren und reduziert als Elektronendonoren.²¹

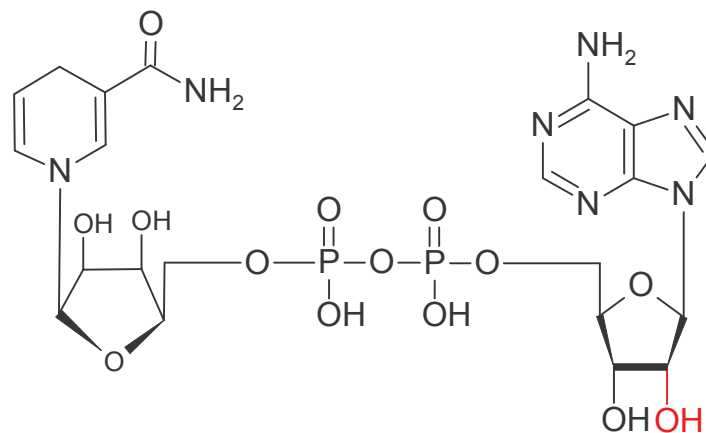


Abbildung 1.1 Strukturformel des NADH, sein Coenzym (NADPH) hat an der rot markierten Stelle eine Phosphatgruppe

Diese Coenzyme können zur Fluoreszenz angeregt werden und verraten durch ihr Fluoreszenzverhalten bestimmte Bedingungen, die in der Zelle vorliegen. Dabei sind die zu erwartenden Ergebnisse von unmittelbarem biomedizinischem Interesse, da Funktionsdefekte in den β -Zellen der Pankreasinseln zum Diabetes Typ II, einer Krankheit von höchster gesundheitspolitischer Relevanz, führen. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind die durchzuführenden Glucosestimulationen von insulinproduzierenden MIN6 β -Zellen und die gleichzeitige biexponentielle FLIM-Auswertung des NAD(P)H-Signals erste Messungen dieser Art.

Eine besondere Art der Zweiphotonenanregung soll aufgegriffen werden, um den nutzbaren Wellenbereich eines Ti:Saphir Lasers zu erweitern. Diese funktioniert mit einer so genannten Zwei-Farben Zwei-Photonen Anregung. Eine Überlagerung von Femtosekundenpulsen verschiedener Wellenlängen, könnte dabei helfen, das biologische „Energieträgermolekül“ ATP fluoreszenztechnisch in hoher zeitlicher Auflösung zu untersuchen.

Die Arbeit gliedert sich in den Theorieteil, in dem grundlegende Überlegungen über die Eigenschaften von Licht, Laser, Zweiphotonenanregung und die Fluoreszenz (bzw. dessen Lebensdauer) gemacht werden. Das nichtiterative biexponentielle Auswerteverfahren (PRONY-Methode) wird hier auch vorgestellt. Im anschließenden Kapitel über Materialien und Methoden werden Geräte und Verfahrensweisen für die angewendete Zweiphotonenmikroskopie vorgestellt. Die biologischen Präparate, die eigenverantwortlich kultiviert wurden, und deren Handling bei den Messungen werden hier vorgestellt. In Kapitel 4 werden die angewandten Imagingtechniken dargestellt, um inter- und subzellulär den pH-Wert an künstlichen Hautkonstrukten zu untersuchen (Kapitel 5). Im anschließenden Kapitel 6 wird eine Methode vorgestellt, die es erlaubt den Energiestoffwechsel von Zellen zu visualisieren. Diese wird dann beispielhaft an insulinproduzierenden β -Zellen unter gleichzeitiger Glucosestimulation angewendet. In Kapitel 7 wird schließlich ein Experiment demonstriert, das die Zwei-Farben Zwei-Photonen Anregung mit Femtosekundenpulsen eines Ti:Saphir Lasersystems ermöglichen soll.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *Lineare und Nichtlineare Optik*

Optische Messungen gestatten uns einen besonders tiefen Einblick in die Natur und vermitteln uns eine Vorstellung vom Bau der Materie. Die meisten Fortschritte auf dem Gebiet der Biologie und Physik wurden wesentlich durch die Erfolge der optischen Messtechnik mit bedingt, und immer noch hat dieser Bereich in der Forschung einen sehr hohen Stellenwert.

Im Folgenden finden optische Phänomene und Gesetze Beschreibung, die für das Verständnis von Ausbreitung von Licht und dessen Wechselwirkung mit Materie wichtig sind. Unter Licht versteht man gemeinhin den für das menschliche Auge sichtbaren Teil des elektromagnetischen Spektrums (800 bis 400 nm). Viele Methoden in der Optik sind jedoch auch für Gebiete diesseits und jenseits des sichtbaren Bereiches gültig. Licht ist also eine Naturerscheinung im Spektralbereich der optischen Strahlung, wobei sich die optische Strahlung (von 100 nm bis 1 mm siehe Tabelle 2.1) innerhalb des elektromagnetischen Spektrums definiert und das UV, das sichtbare Licht und das IR umfasst.²² Sie unterscheiden sich vor allem in den physikalischen Prinzipien, nach denen die Strahlung erzeugt wird. Die Auswirkung der verschiedenen Strahlungsarten auf Stoffe und biologische Systeme kann sehr unterschiedlich sein. Diese können für Diagnose (Röntgen-Strahlung für Bildaufnahmen des Skeletts) über therapeutische Maßnahmen (IR-Strahlung zur örtlichen Behandlung von Entzündungen) bis hin zum Einsatz als Schneidwerkzeuge (Laserskalpell in der Gefäßchirurgie) genutzt werden.

Tabelle 2.1 Elektromagnetisches Spektrum geordnet nach ihrer Wellenlänge

Rundfunk und Fernsehen	10 km...1 m
Mikrowellen	1 m...1 mm
optische Strahlung	1 mm...100 nm
Infrarot (IR)	1 mm...780 nm
IR-C	1 mm...3 μm
IR-B	3 μm ...1,4 μm
IR-A	1,4 μm ...780 nm
sichtbares Licht (VIS)	780 nm...380 nm
Ultraviolett (UV)	380 nm...100 nm
UV-A	380 nm...315 nm
UV-B	315 nm...280 nm
UV-C	280 nm...100 nm
Röntgenstrahlung	10 nm...0,001 nm
Gammastrahlung	0,1 nm... 10^{-5} nm
kosmische Strahlung	10^{-4} nm...

Licht hat einen Doppelcharakter, und wird nach historischen Experimenten in ein Wellenmodell und in ein Quantenmodell eingeordnet. Dieser Welle-Teilchen-Dualismus ist nach quantenphysikalischer Deutung vertretbar, und kann problemspezifisch angewendet werden. Eine wesentliche Seite des Lichtes ist seine Erscheinungsform als elektromagnetische Welle. Hier stehen die elektrische Feldstärke \mathbf{E} , die magnetische Feldstärke \mathbf{H} und die Ausbreitungsrichtung der Welle senkrecht aufeinander. Sie breitet sich mit der Lichtgeschwindigkeit c nach

$$c = \lambda \cdot \nu \quad (2.1)$$

aus. Geht man auf den Teilchencharakter des Lichtes näher ein, so kann man dem Photon eine Energie E

$$E = h \cdot \nu \quad (2.2)$$

und den Impuls p

$$p = \frac{h}{\lambda} \quad (2.3)$$

zuordnen (h Planck-Konstante, ν Frequenz und λ Wellenlänge).

Das Photon besitzt keine Ruhemasse, wohl aber eine bewegte Masse m . Diese ist nach der Einstein-Formel mit der Energie E und der Lichtgeschwindigkeit c verknüpft:

$$E = m \cdot c^2 \quad (2.4)$$

Die Lichtgeschwindigkeit ist eine Naturkonstante und die Ausbreitungsgeschwindigkeit elektromagnetischer Wellen im Vakuum beträgt $c_0 = 299\,793\,\text{km/s}$. In einem Stoff mit der Brechzahl n beträgt die Phasengeschwindigkeit c des Lichtes

$$c = \frac{c_0}{n} \quad (2.5)$$

2.1.1 Brechung

Die Brechung ist die Ablenkung des Lichtes durch Brechzahländerung längs des Lichtweges. Anders gesagt, tritt eine Richtungsänderung an der Grenzfläche von zwei Stoffen unterschiedlicher optischer Dichte durch lokale Änderung ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit auf. Man sagt, das Licht wird gebrochen. Die Brechzahl, bzw. der Brechungsindex, ist eine dimensionslose Kennzahl für diese optische Eigenschaft der Brechung.

Die Abhängigkeit der Lichtgeschwindigkeit vom Brechungsindex (bzw. Brechzahl) nach Formel (2.5) hat für viele optische Aufbauten wichtige Konsequenzen. Ebenso die Abhängigkeit der Brechzahl von der Wellenlänge (Dispersion). Die Dispersion ist eine Folge des Mitschwingens von Teilchen im Feld der elektromagnetischen Lichtwelle. Bei einem Experiment, bei dem gleichzeitig ein blauer und ein roter Lichtstrahl durch eine Sammellinse geschickt werden, muss z.B. beachtet werden, dass durch die Dispersion der Brennpunkt für den blauen Strahl kürzer ist als für den Roten (siehe hierzu Zwei-Farben Zwei-Photonen Anregung). Man spricht dann von einer chromatischen Abberation (Abbildungsfehler). Gerade bei Lasern mit kurzer Pulsdauer ($< \text{ps}$), müssen beim Verbauen von optischen Bauelementen auch Phänomene wie Pulsverbreiterung beachtet werden. Hierzu ein Beispiel:

Wir nehmen einen 825 nm Laserpuls mit einer Pulsdauer von etwa 100 fs und schicken diesen durch eine $d = 5 \text{ mm}$ dicke Linse. Wie groß ist die minimale Pulsverbreiterung? Dazu muss man sich die (minimale) spektrale Breite berechnen, die sich über die Heisenbergsche Unschärfe

$$\Delta E \cdot \Delta t \geq \hbar \quad (2.6)$$

zu ca. 20 nm ergibt.

Bei einem universellen optischen Glas (BK7 von SCHOTT) betragen hierzu die Brechungsindizes $n_1(815\text{nm}) = 1,51051$ und $n_2(835\text{nm}) = 1,51010$ also $\Delta n = 0,00041$. Die spektrale Breite von $\pm 10 \text{ nm}$ bewirkt also erst einen Brechzahlunterschied, dieser wiederum verursacht nach Gleichung (2.5) eine unterschiedliche Phasengeschwindigkeit der sich zu $c(815 \text{ nm}) = 198471018,4 \text{ ms}^{-1}$ und $c(835 \text{ nm}) = 198524904,3 \text{ ms}^{-1}$ ergibt. Diese Differenz von $53,9 \text{ km s}^{-1}$ in dem optischen Bauelement erzeugt letztendlich eine Pulsverbreiterung von ca. 7 Femtosekunden. Die Gesamtverzögerung t des Strahls ergibt sich über

$$d = c \cdot t = \frac{c_0}{n} \cdot t \quad (2.7)$$

zu ca. 25 ps. Diese Rechenbeispiele sind für spätere Überlegungen des Zwei-Farben Zwei-Photonen Aufbaus von Relevanz und verdeutlichen die Schwierigkeit bei der Handhabung mit ultrakurzen Pulsdauern.

2.1.2 Effekte der nichtlinearen Optik

Eine andere Form der Brechung ist die „intensitätsabhängige Brechung“. Hier entsteht bei der Ausbreitung eines intensiven Laserpulses in einem Medium mit kubischer Nichtlinearität durch die nichtlineare Polarisierung ein Beitrag Δn zur Brechzahl. Dieser Beitrag sorgt dann für eine Änderung der Brechzahl. Dieses Phänomen wird bei dem „*Kerr-Effekt*“ in Ti:Saphir-Lasern ausgenutzt, um eine Modenkopplung zu erreichen (siehe Kap. 2.2.1). Die Rolle der Brechzahl in verschiedenen Medien und ihre Auswirkung auf experimentelle Fragestellungen wird uns in dieser Arbeit an verschiedenen Stellen begleiten.

Nichtlineare Effekte beruhen darauf, dass bei den mit Lasern erreichbaren elektrischen Feldstärken \mathbf{E} die elektrische Polarisierung \mathbf{P} eine nichtlineare Funktion von \mathbf{E} wird. Die Mehrzahl dieser Effekte kann durch eine Entwicklung von \mathbf{P} nach Potenzen von \mathbf{E} beschrieben werden. Die beschriebene intensitätsabhängige Brechung in Ti:Saphir-Lasersystemen ist z.B. solch ein Effekt. Daneben gibt es viele weitere Effekte, die auf Nichtlinearität beruhen, und für die Spektroskopie ausgenutzt werden.

Frequenzverdopplung:

Die Erzeugung der Zweiten Harmonischen (SHG) dient zur Frequenzverdopplung mit Hilfe von speziellen Kristallen. Hier wird eine kohärente Strahlung mit 2ν (der doppelten Frequenz) durch die Wechselwirkung von Laserstrahlung der Frequenz ν in nichtlinearen Kristallen mit quadratischer Nichtlinearität ($P \sim E^2$) erzeugt. Solche Kristalle sind stets nichtzentrosymmetrisch, haben also eine Ordnung aber keine Inversionssymmetrie. Als Materialien werden hier oft BBO, KDP, LBO oder LiNbO₃ benutzt. Eine SHG kann auch an Oberflächen und Grenzflächen auftreten.

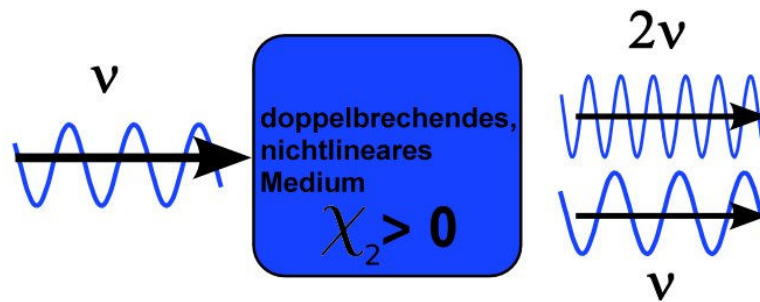


Abbildung 2.1 Erzeugung der zweiten Harmonischen in einem nichtlinearen Medium

Ein Laserlicht mit hoher Intensität besitzt eine große Feldstärke. Dadurch wird die Polarisation P der Materie, die normalerweise nur von dem Term erster Ordnung abhängig ist, auch von der zweiten Ordnung ($n = 2$) abhängig, wodurch P aus zwei Beiträgen besteht.

$$P = \varepsilon_0 \sum_n \chi^{(n)} E^n \quad (2.8)$$

(mit χ^n der dielektrischen Suszeptibilität)

Die zwei Beiträge setzen sich aus einem konstanten Term und einem Term, der mit der doppelten Frequenz 2ν schwingt, zusammen. Dieser letzte Term erzeugt im nichtlinearen Kristall nun eine sog. zweite Harmonische mit der Frequenz 2ν . Damit die zweite Harmonische und der Grundstrahl den Kristall gleichzeitig an einer Stelle verlassen können, muss dieser doppelbrechend sein. Das heißt, dass er für beide den gleichen Brechungsindex vorweisen muss.

2.2 Der Laser

Der Laser gehört zu den zentralen Arbeitsgeräten der später aufgezeigten Experimente. Seit dem Bau des ersten Rubin-Lasers im Jahre 1960 durch MAIMAN und BASOV, sind viele verschiedene Lasertypen gefolgt, die mittlerweile enormen Einsatz in verschiedensten Gebieten finden. Die wichtigsten Lasertypen sind Festkörper-, Halbleiter-, Gas- und Farbstofflaser.

Die Abbildung 2.2 zeigt, das Wellenlängenspektrum welches von verschiedensten Lasern mittlerweile abgedeckt werden können.

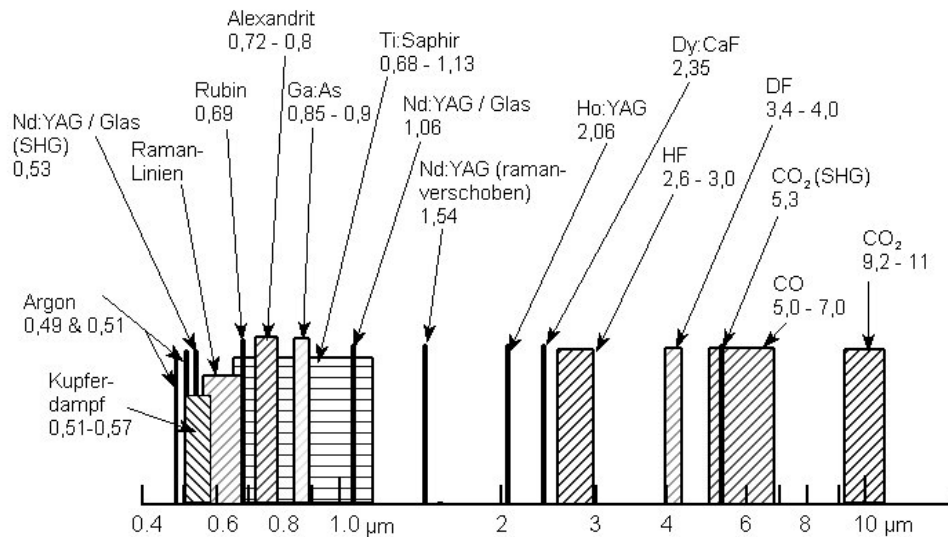


Abbildung 2.2 Wellenlängenspektrum verschiedener Laser (Angaben in µm)

Gegenüber konventionellen Lichtquellen (Glüh- und Gasentladungslampen) zeichnen sich Laser durch starke Bündelung (geringe Divergenz), geringe spektrale Linienbreite (Monochromasie, Kohärenz), hohe Intensität und die Möglichkeit, kurze Pulse zu erzeugen aus. Gerade letzteres ist bei Titan-Saphir-Lasern besonders gegeben, hier sind Pulsbreiten von einigen Femtosekunden Stand der Technik.

2.2.1 Der Titan-Saphir-Laser

Unter den abstimmbaren Festkörperlaser weißt der Ti:Saphir-Laser einen besonders großen Wellenlängenbereich auf. Durch geeignete Dotierung kristalliner und glasförmiger Festkörper mit atomaren oder molekularen Ionen, z.B. Alexandrit (BeAl_2O_3 dotiert mit Cr^{3+} -Ionen) oder eben Titan-Saphir (TiAl_2O_3), kann das Absorptionsverhalten dieser Festkörper in weiten Grenzen variiert werden. Ein Blick auf das Spektrum (Abbildung 2.3) des Ti:Saphir Kristalls zeigt einen Emissionswellenlängenbereich von Mitte 600 bis über 1100 nm. Der Abstimmbereich ist beinahe genau so groß, was unter anderem auch auf das Fehlen von Selbstabsorption vom oberen Laserniveau aus zurückzuführen ist.²³

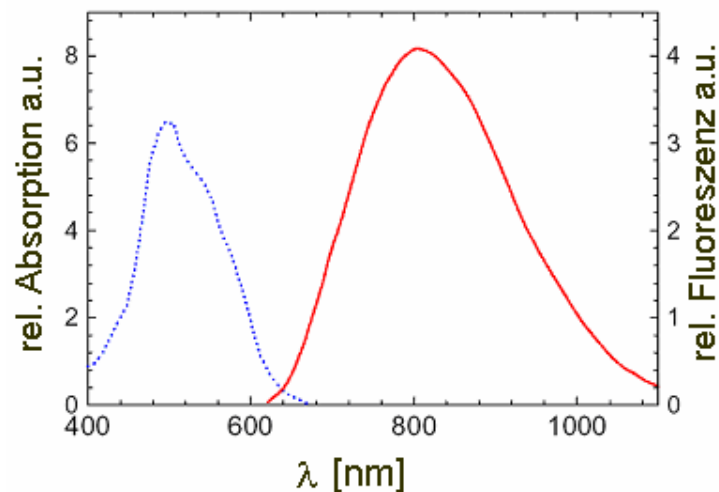


Abbildung 2.3 Absorptions- und Emissionsspektrum eines Titan-Saphir-Kristalls

Durch Wechselwirkungen der dotierten Ionen mit dem Wirtsgitter sind die Energieniveaus der Ionen häufig stark verbreitert, und es entsteht beim optischen Pumpen ein kontinuierliches Fluoreszenzspektrum, das sich über einen ausgedehnten spektralen Bereich erstreckt. In diesem Fall ist es das Kristallfeld des Ti^{3+} -Ions im Saphir, welches eine starke Aufspaltung und zusätzlich eine Verbreiterung durch Gitterschwingungen (Phononen) erfährt. Die resultierenden Absorptions- und Fluoreszenzspektren zeigen indirekt diese große Aufspaltung. Sein Emissionsmaximum liegt bei ca. 800 nm, in diesem Bereich haben Ti-Saphir-Laser ihre maximale Leistung. Die breite Absorptionsbande um 500 nm bietet ein effektives Pumpen mit Argonlasern oder frequenzverdoppelten Nd:YAG-Lasern.

Modenkopplung:

Der Vergleich von Femtosekunden- und „normalen“ Lasern zeigt, dass in den Femtosekundenlasern viele axiale Moden simultan anschwingen, dass aber die Phasen der Moden völlig unkorreliert sind. Sie besitzen statistische und zeitlich schwankende Phasenbeziehungen zueinander. Dies erzeugt zufällige, konstruktive und destruktive Überlagerungen der Feldstärkeamplituden, was wiederum zu starken Intensitätsschwankungen führt. Solche spontanen Modenkopplungen führen dann zu schnellen, schwankenden Modulationen der Laserleistung. Eine Modenkopplung beschreibt eine oder mehrere Techniken, die dazu genutzt werden, um eine Korrelation zwischen den Phasen zu generieren und dadurch gewollte Intensitätsmaxima zu erzeugen. Eine konstruktive Überlagerung der benachbarten Moden wird erzwungen. Kann man die Phasendifferenz der anschwingenden Moden unterdrücken, so dass die Feldstärkeamplituden sich bei jedem Resonatorumlauf an einem Ort alle konstruktiv überlagern, erhält man sehr kurze Pulse hoher Intensität.

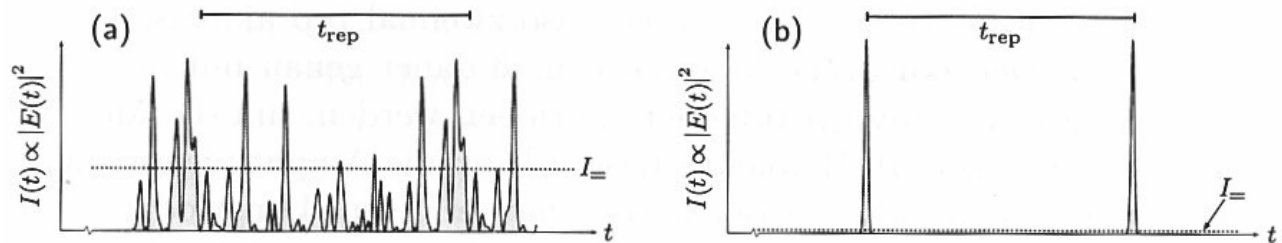


Abbildung 2.4 Zeitlicher Verlauf der Laserausgangsleistung (a) ohne und (b) mit Modenkopplung (die gemittelte Leistung $I_ =$ ist in beiden Fällen dieselbe, man beachte die massiv unterschiedliche Skalierung)²⁴

Diese beschriebene Methode gibt es als so genannte aktive und passive Modenkopplung. Die extern gesteuerte Modulation der Verluste (Verstärkung) liegt bei einer aktiven Modenkopplung vor. Im Falle des Ti:Saphir-Lasers haben wir eine passive Modenkopplung (oder hier im Speziellen eine sog. Kerr-Linsen-Modenkopplung). Hierbei wird für hohe Intensitäten I der Brechungsindex n eines Materials intensitätsabhängig (Kerr-Effekt). Das Lasersignal fluktuiert von alleine zwischen Dauerstrich (cw) und modengekoppelt. Bei der Modenkopplung in Abbildung 2.4 kann man sich die gesamte Intensität in den beiden Peaks vereint vorstellen. Hieraus resultieren eine höhere Intensität (gepulst) und wegen der Selbstfokussierung ein schmalerer Strahl. Eine Blende vor dem Auskoppelspiegel wird teilweise geschlossen, um Verluste für den cw-Strahl zu erhöhen.

2.3 Zweiphotonenanregung

Die Energiezustände eines Moleküls unterteilen sich in elektronische, Schwingungs- und Rotationszustände. Jeder elektronische Zustand besteht aus mehreren Schwingungszuständen, die wiederum aus mehreren Rotationszuständen bestehen. Ein vereinfachtes Tableau der Energieniveaus und der möglichen Übergänge eines Moleküls bieten Jablonski-Diagramme (Abbildung 2.8) an. Unter normalen Bedingungen befindet sich das Molekül im Grundzustand S_0 . Wenn das Molekül mit Licht passender Wellenlänge bestrahlt wird, geht es in einen der angeregten Singulettzustände über. Dieser Übergang kann durch die Absorption eines aber auch mehrerer Photonen erfolgen.

Die Zweiphotonenanregung (ZPA) ist ein Prozess, in dem zwei Photonen einer definierten Energie simultan absorbiert werden, um in diesen angeregten Zustand zu gelangen. Das Phänomen der ZPA wurde bereits 1931 von MARIA GÖPPERT-MAYER im Rahmen ihrer Disserta-

tion²⁵ theoretisch behandelt, in der sie die ZPA als Umkehrprozess zu der Simultanemission zweier Lichtquanten beschrieb. Sie schrieb, dass „[...] zwei Lichtquanten, deren Frequenzsumme gleich der Anregungsfrequenz des Atoms ist, zusammenwirken, um das Atom anzuregen [...]“. Die Wahrscheinlichkeit einer ZPA ist äußerst gering, so dass ein extrem hoher Photonenfluss vorhanden sein muss. Dieser kann hervorragend mit Lasern gewährleistet werden, was auch dazu führte, dass erst 30 Jahre später, als der erste Rubin-Laser realisiert wurde, dieses Phänomen experimentell nachgewiesen werden konnte. Heute zählt die ZPA in vielen Bereichen der Spektroskopie als etabliert, das Implementieren in die Mikroskopie der so genannten Zweiphotonen-Mikroskopie geschah Anfang der 1990er Jahre durch DENK et al.⁸

2.3.1 Zwei- und Mehrphotonenprozesse

Wenn Laserlicht der Wellenlänge λ_L in ein Medium fokussiert wird, von dem es bekannt ist, dass es eine gewöhnliche Einphotonenabsorption bei der halben Wellenlänge $\frac{1}{2}\lambda_L$ macht, so kann dieses Laserlicht, sofern es die Auswahlregeln erlauben, durch einen Zweiphotonenprozess absorbiert werden. Dieser Zweiphotonenprozess geschieht, ähnlich dem Ramanübergang, über eine virtuelle Zwischenstufe. Die Ähnlichkeit der Zweiphotonen- und Raman-Spektroskopie zeigt sich nicht nur an der virtuellen Zwischenstufe und dem Zweiphotonenprozess, sondern auch in den gemeinsamen Auswahlregeln.²⁶ Die Abbildung 2.5(I) zeigt diesen Ramanübergang aus einem virtuellen Zustand, der auch für die *Stokeschen* Verschiebungen verantwortlich ist. Die Zweiphotonenabsorption kann stark vereinfacht ebenso als eine vorübergehende Anregung von einem Grundzustand in einen virtuellen Zustand angesehen werden. Aus diesem wird es dann mit einem zweiten Photon in den angeregten Zustand befördert. Dabei können die beiden Photonen dieselbe oder unterschiedliche Energien haben (siehe Kap. 7.1). Sinngemäß können eine gewisse Anzahl an n Photonen absorbiert werden, um den Übergang von einem Grundzustand in einen angeregten Zustand (über $n-1$ virtuelle Zustände) zu gewährleisten.

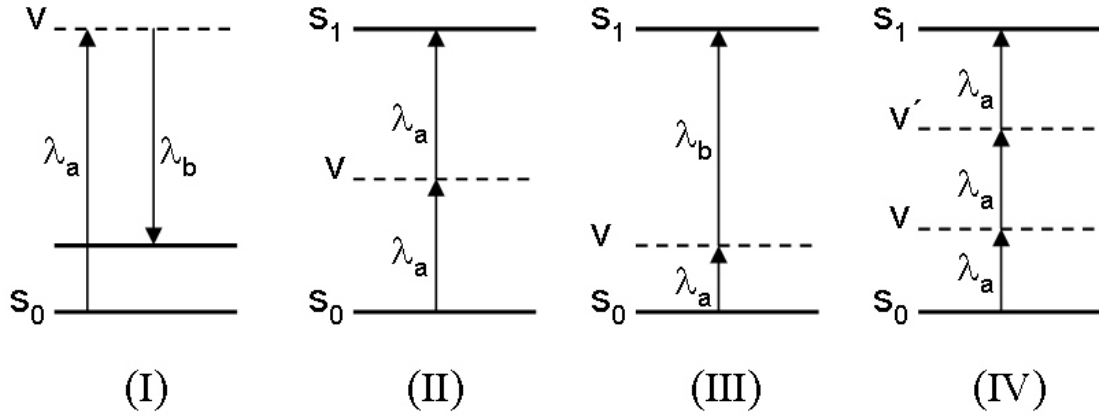


Abbildung 2.5 Übergänge bei Mehrphotonenprozessen²⁶ (I) Raman-Streuung, (II) ZPA mit gleicher Photonenenergie, (III) ZPA mit unterschiedlicher Photonenenergie, (IV) Dreiphotonenabsorption

Der Prozess der ZPA ist aber eine simultane Absorption zweier Photonen. Simultan meint in diesem Falle eine quantenmechanisch kurze Zeitspanne Δt . In dieser Zeitspanne müssen die beiden Photonen zur Verfügung stehen, um zusammen den Übergang zu befähigen. Die genannte Zeitspanne unterliegt einer bestimmten Energie-Zeit Unschärfebeziehung wie sie von der Heisenbergschen Unschärfe bekannt ist (vgl. Gleichung (2.6)).²⁶ Anders gesagt benötigt diese Absorption der Photonen der Energie ΔE mindestens die Zeit

$$\Delta t = \frac{\hbar}{\Delta E} \quad (2.9)$$

Charakteristische Zeitspannen liegen bei optischen Übergängen im untersten Femtosekundenbereich (10^{-15} s). Dies entspricht auch den Lebensdauern für die obigen virtuellen Zustände.

In der Eingangs erwähnten Arbeit von GÖPPERT-MAYER²⁵, konnte mit quantenmechanischer Störungsrechnung gezeigt werden, dass die Übergangswahrscheinlichkeit W zwischen diesen Zuständen proportional zur Intensität der beiden Photonen ist

$$W \propto I_1 \cdot I_2 \quad (2.10)$$

Geht man von einer ZPA mit zwei gleichen Photonen einer Anregungsquelle aus, gilt

$$W \propto I^2 \quad (2.11)$$

Diese quadratische Abhängigkeit der Übergangswahrscheinlichkeit manifestiert sich letztendlich im Experiment in der Anregungswahrscheinlichkeit. Letztere ist bei einer ZPA um Größenordnungen kleiner als bei der EPA. Diese geringe Anregungswahrscheinlichkeit gehört jedoch zu den intrinsischen Vorteilen der Zwei-Photonen-Mikroskopie (siehe Abbildung 2.6).

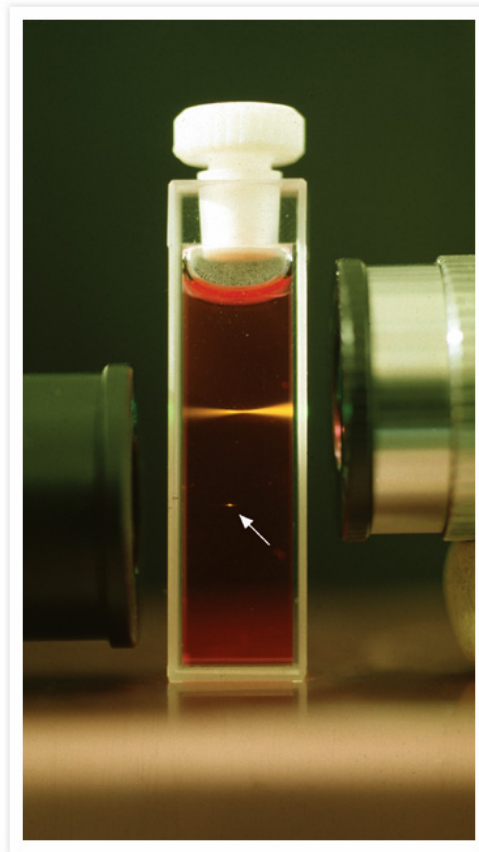


Abbildung 2.6 Anregungsvolumen bei EPA (oben) und ZPA (unten, siehe Pfeil) im Vergleich.²⁷ Bei der ZPA gibt es eine quadratische Abhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit von der Intensität. Dadurch wird ein sehr kleines Volumen in der Probe zur Fluoreszenz angeregt.

Allgemein können die Wahrscheinlichkeiten der unterschiedlichen Absorptionsprozesse als Geschwindigkeitskonstanten für die Elektronenübergänge (k_i) angesehen werden.

Für die Einphotonenabsorption gilt

$$k_1 = \sigma_1 \cdot P, \quad (2.12)$$

für die Zweiphotonenabsorption

$$k_2 = \delta \cdot P^2 \quad (2.13)$$

und für die Dreiphotonenabsorption

$$k_3 = \sigma_3 \cdot P^3 \quad (2.14)$$

P ist hierbei der Photonenfluss und σ_1 , δ und σ_3 die entsprechenden Absorptionsquerschnitte. Letztere verkleinern sich um viele Größenordnungen bei Mehrphotonenabsorptionen (z.B. $\sigma_1 = 10^{-16} \text{ cm}^2$, $\delta = 10^{-48} \text{ cm}^4 \text{ s} / \text{Photon}$ und $\sigma_3 = 10^{-83} \text{ cm}^6 \cdot \text{s}^2 / \text{Photon}^2$), so dass genügend hohe Absorptionsraten im Multiphotonenbereich erst durch sehr hohe Photonenflüsse gewährleistet sind.

2.3.2 Auswahlregeln

Der optisch nichtlineare Prozess der Zweiphotonenanregung ermöglicht Zustände, die mittels Einphotonenanregung nicht möglich wären. Optische Übergänge sind an Auswahlregeln gebunden. Diese beschreiben die Zustandsänderungen, die bei Übergängen einer bestimmten Art, wie z.B. durch Absorption oder Emission von elektromagnetischer Strahlung, möglich sind. Bei optischen Übergängen muss die Bedingung der Drehimpulserhaltung beachtet werden, hierbei muss der Spindrehimpuls des beteiligten Photons berücksichtigt werden. Da das Photon zu den Bosonen gehört hat es einen Spin von $s = 1$. Bei Absorption eines Photons wird dessen Drehimpuls auf das Molekül übertragen und ändert den Gesamtdrehimpuls des letzteren. Werden zwei Lichtquanten in einem Elementarakt absorbiert, hat dies zum Teil andere Konsequenzen für die erlaubten Übergänge. Es gilt also festzuhalten, dass die Auswahlregeln für EPA- und ZPA-Prozesse sich unterscheiden. Wird ein Atom oder Molekül unter Emission eines Elektrons ionisiert, muss dessen Drehimpuls auch beachtet werden. Wir schauen uns folgende Auswahlregeln an:

Drehimpulsänderung

Die Änderung der Gesamtdrehimpulsquantenzahl J bei optischen Übergängen bei EPA-Prozessen ist $\Delta J = -1, 0, +1$ und bei ZPA-Prozessen $\Delta J = -2, -1, 0, +1, +2$. Hieraus leiten sich, die in der Molekülspektroskopie bekannten Bezeichnungen der Zweige (eines Rotationsspektrums) ab; $\Delta J = -2, -1, 0, +1, +2$ sind die O-, P-, Q-, R-, S-Zweige eines Spektrums.

Paritätsänderung

Die Parität der beteiligten Zustände muss sich beim Übergang bei EPA-Prozessen ändern; es gilt $(+) \leftrightarrow (-)$ (auch g und u nach gerade und ungerade bezeichnet). Moleküle die ein Inversionszentrum besitzen, erlauben bei der Einphotonenanregung nur elektrische Dipolübergänge von geraden zu ungeraden Zuständen, also nur zwischen Zuständen ungleicher Parität. Gerade bzw. ungerade bezieht sich auf die Orbitalwellenfunktionen, ob hier eine Symmetrie oder Antisymmetrie in Bezug auf die Inversion vorliegt. Hier sind Übergänge zwischen Zuständen gleicher Parität laut dieser Auswahlregel verboten. Bei ZPA-Prozessen hingegen geschieht

der Übergang zwischen Zuständen gleicher Parität; hier gilt $(+) \leftrightarrow (+)$ und $(-) \leftrightarrow (-)$. Hier sind Übergänge zwischen Zuständen verschiedener Parität verboten.

Betrachtet man nun die ZPA, ist der Grundzustand und das angeregte Niveau über zwei elektrisch-dipol erlaubte Übergänge durch ein virtuelles Niveau verbunden. Damit ergibt sich, dass sich (vorab analog zur EPA) die Parität beim ersten Übergang auf das virtuelle Niveau, jedoch dann nochmals beim zweiten Übergang in das angeregte Niveau, ändert. In Summe also die Parität mit gerade auf gerade oder von ungerade auf ungerade erhalten bleibt. Man sollte jedoch nicht aus den Augen verlieren, dass schon bei großen Atomen einige Auswahlregeln zum Teil durch Spin-Bahn-Kopplungen des Elektrons „aufgeweicht“ werden. Trotzdem verdeutlichen diese Überlegungen, dass sich mit der ZPA prinzipiell Zustände von Molekülen erreichen lassen können, die mittels EPA unzugänglich sind.²⁸ Selbst Kohlenwasserstoffe wie Cyclohexan oder Methylcyclohexan, die im sichtbaren Wellenlängenbereich keine Absorption zeigen, konnten von BIRCH et al. durch einen Zweiphotonenprozess angeregt werden.²⁹

Jedoch sind es in dieser Arbeit nicht irgendwelche per EPA unerreichbaren Zustände, die die ZPA interessant machen. Betrachtet man bekannte Fluoreszenzfarbstoffe und deren Spektren, so bietet sich typischerweise ein Bild wie in Abbildung 2.7.

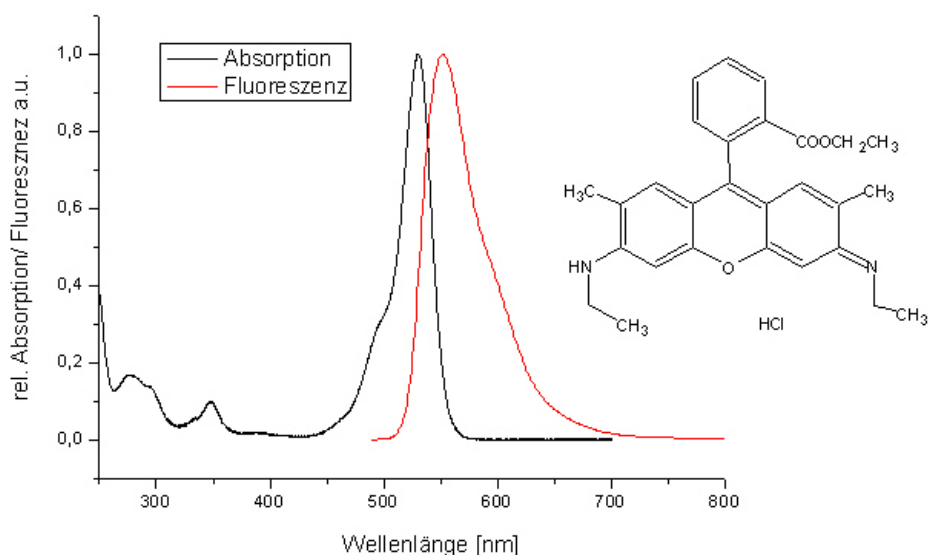


Abbildung 2.7 Absorptions- (EPA) und Emissionsspektrum von Rhodamin 6G

Anregungs- und Emissionsspektrum sind hier überlagert. Die EPA hat ihr Maximum bei ca. 530 nm, die Zweiphotonenanregung hingegen kann bei 800 nm gut durchgeführt werden³⁰ (siehe zu dieser Abweichung $\lambda_{\text{EPA}} \neq 2\lambda_{\text{ZPA}}$ Kap. 2.4.2). Der Relaxationsprozess aus einer ZPA ist wiederum weitestgehend identisch mit dem einer EPA, die Fluoreszenzspektren sehen also, ob mit einem oder zwei Photonen induziert, gleich aus. Es bleibt demnach der sich bietende

experimentelle Vorteil für die ZPA, dass die Anregungswellenlänge spektral stets weit entfernt von der Fluoreszenzwellenlänge ist.

Tabelle 2.2 zeigt einige Auswahlregeln für den Übergang zwischen zwei Zuständen der hier betrachteten Systeme.

Tabelle 2.2 Einige Auswahlregeln für EPA und ZPA

	Einphotonenübergänge	Zweiphotonenübergänge
Drehimpulsänderung	$\Delta J = -1, 0, +1$ (P-, Q-, R-Zweig)	$\Delta J = -2, -1, 0, +1, +2$ (O-, P-, Q-, R-, S-Zweig)
Paritätsänderung	$(+) \leftrightarrow (-)$	$(+) \leftrightarrow (+), (-) \leftrightarrow (-)$

Weitere spektroskopische Auswahlregeln können anhand von Symmetrieeigenschaften von Molekülen und Orbitalen erklärt werden.* Die Gruppentheorie, die diese Symmetrieeigenschaften beschreibt, ist hierbei ein wichtiges Instrument. Ein angeregter Zustand eines Moleküls hat eine bestimmte Symmetrie und kann mit Hilfe von Charaktertafeln in eine bestimmte Symmetrierasse eingeteilt werden. So kann es z.B. sein, dass eine ZPA an einem Molekül nur mit zwei Photonen unterschiedlicher Polarisation durchzuführen ist.³¹ Beispiel an einem Wassermolekül:

Das Wassermolekül hat eine C_{2v} -Symmetrie und die Charaktertafel hierzu hat die Form

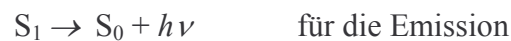
C_{2v}	E	C_2	$\sigma_v(xz)$	$\sigma_v'(yz)$		
A_1	1	1	1	1	z	x^2, y^2, z^2
A_2	1	1	-1	-1	R_z	xy
B_1	1	-1	1	-1	x, R_y	xz
B_2	1	-1	-1	1	y, R_x	yz

Betrachtet man eine ZPA von der Symmetrierasse A_1 nach A_2 , so ist dies mit zwei gleichen Polarisationen nicht möglich, da das Produkt aus diesen nicht wie die totalsymmetrische Darstellung transformieren kann ($A_1 \not\rightarrow A_2$). Verknüpft man diesen Übergang jedoch mit zwei Photonen, deren Polarisationen senkrecht zu den Übergangsdipolmomentvektoren μ_1 und μ_2 stehen, so ist dieser Übergang erlaubt ($A_1 \otimes \mu_1 \otimes \mu_2 \otimes A_2 \in A_1$). Mit Hilfe solcher Überlegungen und Experimenten mit unterschiedlich polarisierten Photonen hat McCLAIN schon Anfang der 1970er Jahre Symmetrien angeregter Zustände untersucht.³²

* Diese Folgerungen über Auswahlregeln stammen aus der Betrachtung von so genannten Übergangsmatrixelementen (Fermis Goldene Regel) und unter welchen Symmetrieeoperationen diese gleich Null oder ungleich Null sind.

2.4 Fluoreszenzspektroskopie

Die Auswahlregeln beschreiben, unter welchen Umständen ein Atom oder Molekül durch optische Übergänge in einen angeregten Zustand versetzt werden können. Beim Zurückkehren von diesem energetisch angeregten Zustand in einen Energieärmeren, kann das Atom bzw. Molekül Licht emittieren (spontane Emission, Fluoreszenz), wobei die Energie des Photons der Energiedifferenz dieser beiden Zustände entspricht. Der Vorgang kann formal als



angesehen werden, wobei $h\nu$ hier der Term für die Photonenenergie ist (vergleiche Gleichung (2.2)). S_0 ist dabei der elektronische Grundzustand des Fluorophors und S_1 dessen erster angeregter (Singlett-)Zustand. Ein Molekül in seinem angeregten Zustand (hier S_1) kann über konkurrierende Kanäle relaxieren (Abbildung 2.8).

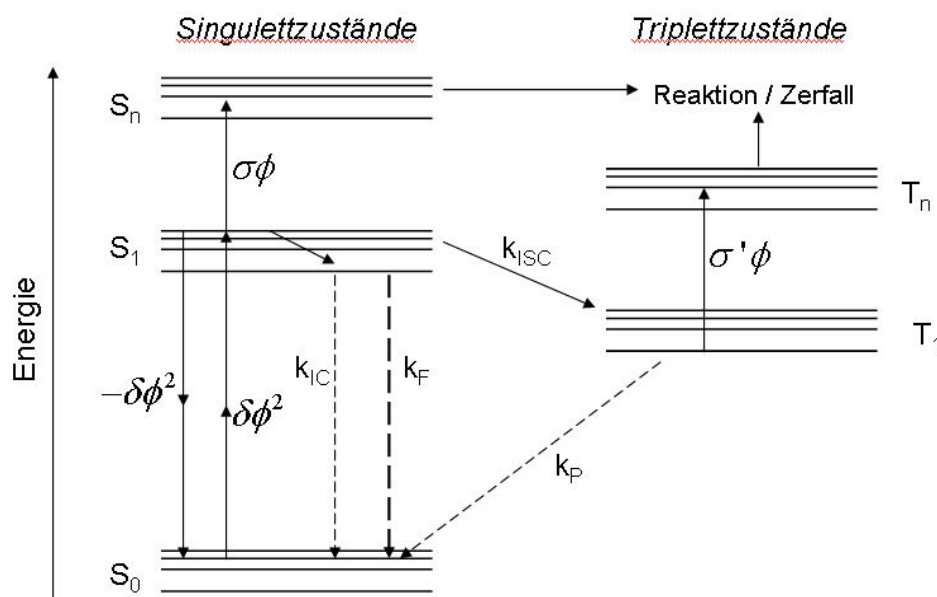


Abbildung 2.8 Jablonski-Schema. Relaxationsprozesse: k_{ISC} Intersystem Crossing, k_{IC} Internal Conversion, k_F Fluoreszenz, k_P Phosphoreszenz. δ und σ stellen die Absorptionsquerschnitte bzw. als Produkt mit ϕ die Übergangsrate dar.

Das angeregte Fluorophor kann Licht emittieren, strahlungslos deaktivieren (z.B. Wärmeabgabe an das Lösemittel, auch internal conversion genannt) oder sogar neue Produkte bilden (Photochemie durch aktivierenden Zerfall, Isomerisierung...). Der Übergang in einen Triplettzustand wird als Intersystem-Crossing bezeichnet. Ebenso kann die Energie an ein zweites Molekül transferiert werden, welches seinerseits in ein angeregtes Niveau übergeht. Die mit

einem Laser induzierte Fluoreszenz (LIF) ist eine oft benutzte Methode. So genannte LIF-Spektren können Auskunft über elektronische Strukturen, Konzentrationen oder Interaktionen eines Moleküls geben. Der Einzug der Fluoreszenz in die Mikroskopie kam später, brachte aber ganz neue Möglichkeiten, da die Unterscheidung der chemischen Komponenten (anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz) in einer biologischen Zelle beträchtliche Forschungsmöglichkeiten bot.

Die Stärke der Fluoreszenz kann anhand seiner Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F abgeschätzt werden, diese ist definiert als³³

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Fluoreszenzphotonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} \quad (2.15)$$

Wird der Übergang aus dem S_1 -Niveau in den Grundzustand unter Fluoreszenz, mit der Geschwindigkeitskonstanten k_F (auch Ratenkonstanten) bezeichnet und die konkurrierenden Prozesse wie das Inter-System-Crossing, Internal Conversion und weiterführende Reaktionen, die den angeregten Zustand depopulieren mit jeweils k_{ISC} , k_{IC} und k_{Re} benannt, so kann diese Fluoreszenzquantenausbeute auch als

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_{IC} + k_{ISC} + k_{Re} + k_F} \quad (2.16)$$

beschrieben werden. Zwischen dieser Quantenausbeute und der Fluoreszenzlebensdauer gibt es folgende Beziehung:

$$\tau_F = \frac{\Phi_F}{k_F} = \frac{1}{k_{IC} + k_{ISC} + k_{Re} + k_F} \quad (2.17)$$

Die Detektion der Fluoreszenz F eines Atoms oder Moleküls hängt von verschiedenen Faktoren ab. Es sei ein bestimmtes Fluorophor und ein Apparat, der dessen Fluoreszenz ermittelt, gegeben, so gilt

$$F = \Phi \cdot \delta \cdot \kappa \cdot \eta \cdot c \cdot P \quad (2.18)$$

Diese Formel für die totale Fluoreszenz einer Einphotonenanregung zeigt diese Abhängigkeit von Φ der Fluoreszenzquantenausbeute, δ dem Absorptionsquerschnitt, κ der Apparatekonstanten, η der Detektionseffizienz, c der Konzentration und P der Anregungsleistung. Neben den farbstoffspezifischen Faktoren Φ und δ , hat man also naturbedingt gewisse Messfehler, die sich hier mit κ und η zeigen. Fasst man diese Faktoren jedoch bis auf die Anregungsleistung zusammen so ergibt sich adäquat zu Formel (2.10) für die totale Fluoreszenzintensität eine lineare Abhängigkeit bei einer EPA und eine quadratische Abhängigkeit für eine ZPA (u.s.w.). Beispielsweise zeigt

$$F = c^* \cdot P^3 \quad (2.19)$$

$$\ln F = \ln c^* + 3 \cdot \ln P \quad (2.20)$$

eine kubische Abhängigkeit von der Anregungsleistung. Betrachtet man nun ein Molekül und dessen Fluoreszenzintensitätsabhängigkeit von der Anregungsleistung (Abbildung 2.9), so lässt sich über eine doppelt logarithmische Auftragung per linearer Regression die Steigung ermitteln. Anhand dieser kann man auch entscheiden ob es sich um eine Zwei- oder Dreiphotonenanregung handelt. In Abbildung 2.9 wurde die Fluoreszenz einer p-Terphenyllösung bei verschiedenen Laserleistungen detektiert, und die beschriebene doppelt logarithmische Auftragung gemacht. In diesem Fall ergibt sich für die Steigung $3,4 \pm 0,2$ bei einem Korrelationsfaktor von 0,999. Dies zeigt, dass es sich wie bei Gleichung (2.20) um eine Dreiphotonenabhängigkeit handelt.

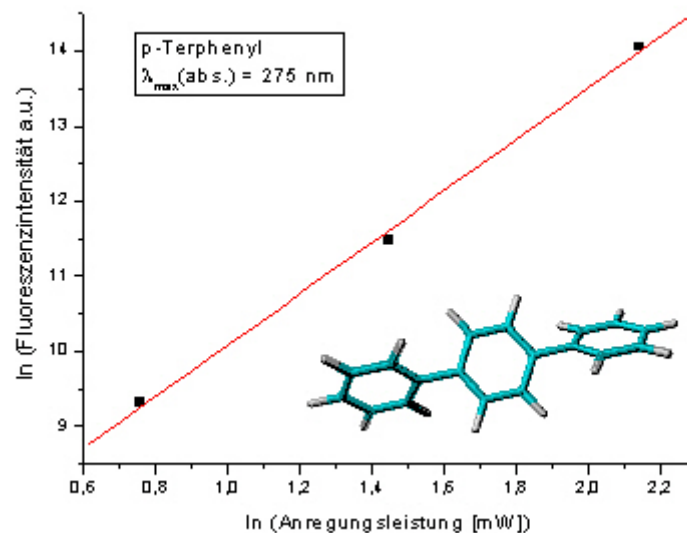


Abbildung 2.9 Drei-Photonen-Anregung des p-Terphenyls mit ca. 800 nm bei verschiedenen Laserleistungen

2.4.1 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer ist ein Maß für die Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verbringt bevor es unter Emission eines Lichtquants relaxiert. Fluoreszenzprozesse gehorchen typischerweise einer Kinetik erster Ordnung:

$$[S_1] = [S_1]_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (2.21)$$

$[S_1]$ wäre die Restpopulation des angeregten Zustandes zur Zeit t , $[S_1]_0$ die Anfangsgröße der Population des angeregten Zustandes und k die Geschwindigkeitskonstante. Die Lebensdauer ist somit definiert als

$$\tau = \frac{1}{k} \quad (2.22)$$

sofern die Desaktivierung des angeregten Zustandes nur über Fluoreszenz erfolgt. Sie steht im direkten Verhältnis zum Relaxationspfad des Moleküls bzw. Atoms (vgl. Gleichung (2.17)). Wenn dieser sehr effizient ist, kann das Fluorophor schnell in den Grundzustand zurückkehren und die resultierende Fluoreszenzlebensdauer ist kurz (Pikosekundenbereich). So genannte verbotene Wege, die mit extrem langen Lebenszeiten verbunden sind, können Triplett-Singlett-Übergänge sein, die man dann Phosphoreszenz nennt (Mikrosekundenbereich und länger). Die Fluoreszenzlebensdauer ist ein wichtiger, sensibler Parameter, welcher Aufschlüsse über molekulare Systeme geben kann. Die Fluoreszenzlebensdauer ist prinzipiell unabhängig von der Fluorophorkonzentration, was einen gewissen Apparativen Vorteil gibt, da sich eine Kalibrierung diesbezüglich erübrigt. Jedoch ist sie sensitiv gegenüber Parametern wie pH-Wert, Brechungsindex, Viskosität sowie Polarität der Umgebung und natürlich von direkten interionischen bzw. intermolekularen Wechselwirkungen. So kann prinzipiell einer dieser Parameter bei konstanten Bedingungen für die Übrigen bestimmt werden. Es sind bereits verschiedene Experimente in dieser Hinsicht gemacht worden, bei denen man sich z.B. physiologischen Parametern wie Ca^{2+} -Konzentrationen, pH-Wert und pO_2 -Wert auf diese Weise gewidmet hat.^{34, 35, 36}

Die Fluoreszenzlebensdauer selbst kann mit einer Intensitätsmessung gegen die Zeit nach der Gleichung

$$I = I_0 \cdot e^{-t/\tau_F} \quad (2.23)$$

berechnet werden. Hierbei wäre τ_F die Fluoreszenzlebensdauer, die per monoexponentiellem Fit zu errechnen ist. Hierbei wird vorausgesetzt, dass nur ein Fluorophor mit einer festen Lebensdauer vorhanden ist. Geht man davon aus, dass sich mehr als eine Lebensdauer hinter dem Fluoreszenzsignal verbirgt, müssen multiexponentielle Fits zur Berechnung herangezogen werden. Die Abbildung 2.10 zeigt exemplarisch zwei Intensitätsverläufe. Die linke Kurve kann nach der obigen Gleichung berechnet werden und stellt eine einzige fluoreszierende Spezies dar. In der rechten Abklingkurve verbergen sich zwei überlagerte Fluoreszenzlebensdauern, welche in der logarithmierten Form deutlich zu erkennen sind.

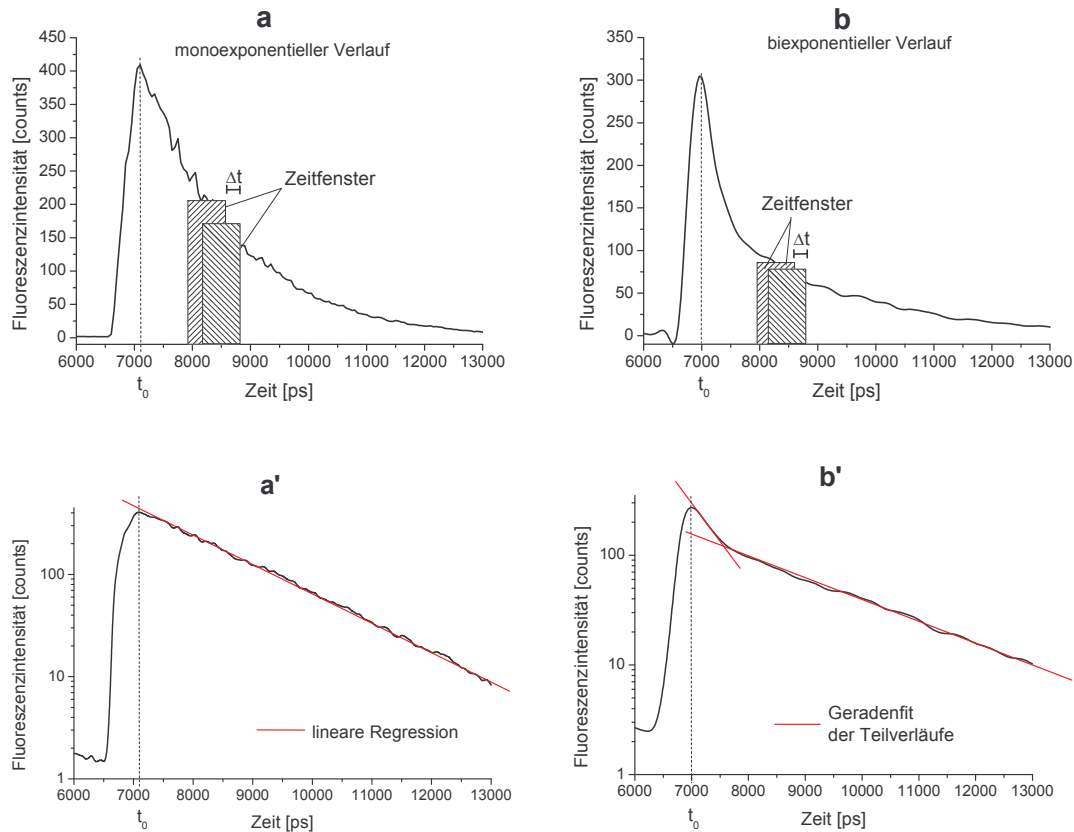


Abbildung 2.10 mono- (links) und biexponentielle (rechts) Abklingkurven der Fluoreszenz mit jeweils den logarithmierten Auftraggungen darunter

Der monoexponentielle Fall ergibt sich in seiner logarithmierten Form aus Gleichung (2.23) zu

$$\ln(I(t)) = \ln(I_0) - t / \tau_F \quad (2.24)$$

dessen reziproke Steigung (Abbildung 2.10 a') entspricht der Fluoreszenzlebensdauer. Die Berechnung von zwei Lebensdauern aus einem Intensitätsabfall wird analog zu dem monoexponentiellen als

$$I(t) = a_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + a_2 \cdot e^{-t/\tau_2} \quad (2.25)$$

beschrieben. Dabei sind τ_1 und τ_2 die einzelnen Lebensdauern, die durch einen biexponentiellen Fit iterativ berechnet werden. Für die spätere FLIM-Anwendung (Kap. 3.2) ist diese iterative Methode jedoch zu rechenintensiv, so dass eine alternative Berechnungsweise für diesen biexponentiellen Fall herangezogen wurde. Die so genannte PRONY-Methode arbeitet mit einem Gleichungssystem und umgeht die Iteration.

PRONY-Methode

Es soll kurz an der biexponentiellen Abklingkurve erläutert werden, wie die PRONY-Methode vorgeht. Wichtig für die Bearbeitung ist, dass man Intensitätswerte in zeitlich äquidistanten Schritten Δt hat, so dass zunächst ausgehend von Gleichung (2.25)

$$I(n) = a_1 \cdot e^{-t_0/\tau_1} \cdot e^{-n\Delta t/\tau_1} + a_2 \cdot e^{-t_0/\tau_2} \cdot e^{-n\Delta t/\tau_2} \quad (2.26)$$

geschrieben werden kann, wobei n (0, 1, 2, ..., m) die Anzahl der Schritte des Zeitfensters anzeigt.

Es wird zu Beginn die Substitution $c = a \exp(-t_0/\tau)$ und $v^n = \exp(n\Delta t/\tau)$ vorgenommen, um auf das Gleichungssystem

$$I_n = c_1 \cdot v_1^n + c_2 \cdot v_2^n \quad (2.27)$$

zu kommen. v_1 und v_2 sind Lösungen einer quadratischen Gleichung:

$$(v - v_1)(v - v_2) = v^2 + s_1 v + s_2 \equiv 0 = \begin{cases} v_1^2 + s_1 v_1 + s_2 = \varphi(v_1) \\ v_2^2 + s_1 v_2 + s_2 = \varphi(v_2) \end{cases} \quad (2.28)$$

Die Multiplikation von $\varphi(v_1)$ und $\varphi(v_2)$ mit ihren korrespondierenden Termen $c_1 v_1^n$ bzw. $c_2 v_2^n$ und Addition der resultierenden Ausdrücke, liefert unter Beachtung von Gleichung (2.27)

$$c_1 v_1^2 + c_2 v_2^2 + s_1 (c_1 v_1 + c_2 v_2) + s_2 (c_1 + c_2) = I_2 + s_1 I_1 + s_2 I_0 = 0 \quad (2.29)$$

Sinngemäß gilt für eine gewisse Anzahl m an zeitlich äquidistanten Schritten

$$\begin{aligned} I_2 + s_1 I_1 + s_2 I_0 &= 0 \\ I_3 + s_1 I_2 + s_2 I_1 &= 0 \\ \vdots & \\ I_m + s_1 I_{m-1} + s_2 I_{m-2} &= 0 \end{aligned} \quad (2.30)$$

Es folgt also ein Gleichungssystem mit $m-1$ Gleichungen. Die durch die Messung erhaltenen Messwerte I_n können nun eingesetzt werden und liefern s_1 und s_2

$$Q = \sum_{n=2}^m (I_n + s_1 I_{n-1} + s_2 I_{n-2})^2 \equiv \text{Minimum} \quad (2.31)$$

Hierbei wird die Methode der Summe der kleinsten Fehlerquadrate benutzt. Die Lebensdauern der Komponenten werden aus den Gleichungen von $\varphi(v_1)$ und $\varphi(v_2)$ erhalten. Letztere führen zu den Lösungen von v_1 bzw. v_2 . Wiedereinsetzen von $\exp(n\Delta t/\tau_1)$ und $\exp(n\Delta t/\tau_2)$ gibt den Ausdruck

$$\tau_{1,2} = n\Delta t / \ln(v_{1,2}) \quad (2.32)$$

Gleichung (2.27) wird wiederum durch Einsetzen von v_1 und v_2 zu einem überbestimmten Gleichungssystem für c_1 und c_2 . Die Methode der kleinsten Fehlerquadratsumme führt zu $c_{1,2}$ und diese zu den Amplituden a_1 und a_2

$$a_{1,2} = -\ln(c_{1,2}) \cdot \tau / t_0 \quad (2.33)$$

Die vorgestellte Methode wird in das FLIM-Verfahren (Kap. 3.2) implementiert und beschleunigt die biexponentielle Auswertung enorm. Vergleichsmessungen in denen zwei Farbstofflösungen unterschiedlich langer Fluoreszenzlebensdauer monexponentiell definiert und nach der Vermischung mit der PRONY-Methode erneut ausgewertet wurden, haben lediglich eine Abweichung von etwa einem Prozent gezeigt.

2.4.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoffe für die Fluoreszenzspektroskopie müssen verschiedenen Anforderungen gerecht werden: Allgemein sollten sie einen hohen Absorptionsquerschnitt verbunden mit geringen ISC-Raten aufweisen. Durch diese beiden Faktoren ist eine hohe Quantenausbeute gewährleistet. Des Weiteren sollte der Farbstoff sein Absorptionsmaximum in der Nähe der genutzten Laserwellenlänge haben. Der hier verwendete Titan-Saphir-Laser hat einen abstimmbaren Wellenlängenbereich von ca. 740 bis 850 nm. Da bei den Experimenten die Zweiphotonenabsorption genutzt wird, ergibt sich für die Farbstoffe, dass sie im UV-VIS-Spektrum (Einphtonabsorption) ihre maximale Extinktion idealerweise im Bereich 370 bis 425 nm erfahren sollten. Jedoch kann das Absorptionsmaximum auch durchaus einige 10 nm außerhalb dieser Bereiche liegen, da die schwächere Anregung an den „Flanken“ der Absorptionskurve durchaus für Fluoreszenzmessungen geeignet ist. Die Verstärkung der Kamera erlaubt hier auch schwache Signale gut zu verarbeiten. Dadurch ergibt sich ein relativ großes spektrales Fenster für die Suche nach zweckmäßigen Farbstoffen. Betrachtet man das Molekül Rhodamin 123 und dessen UV-VIS-Spektrum (Abbildung 2.11), so erkennt man eine steigende Absorption ab etwa 425 nm. Trotz dieser Tatsache lässt sich das Molekül aber bei einer Zweiphotonenanregung mit 800 nm noch gut zur Fluoreszenz anregen!

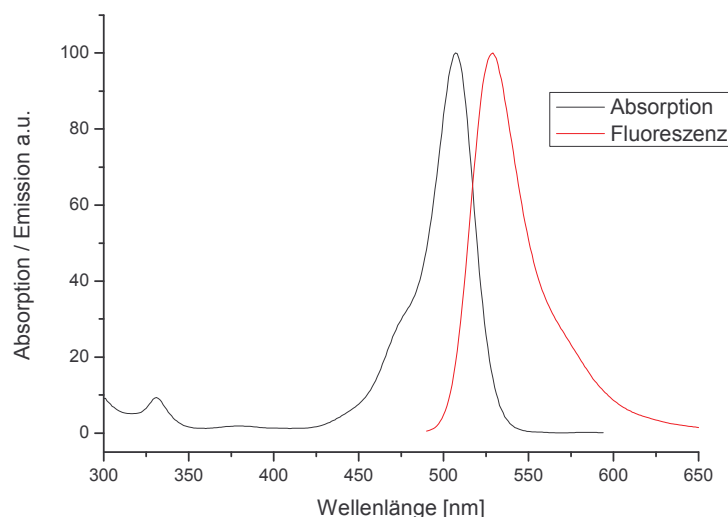


Abbildung 2.11 Rhodamin 123 UV-VIS-/ Fluoreszenz-Spektrum

Hier spielt eine andere Eigenart der Zweiphotonenabsorption eine interessante Rolle: Der Effekt der Blauverschiebung des Zweiphotonenabsorptionsspektrums. Dieser wird mit vibronischen Kopplungen der angeregten elektronischen Zustände erklärt, eine hierdurch verursachte momentane Symmetrieabweichung erlaubt neue Übergänge. Durch diese relativ komplizierten intramolekularen Kopplungen der Elektronen- und Schwingungsterme und der Elektronenterme untereinander werden erst spin- bzw. paritätsverbotene Übergänge erlaubt und Spektren einiger Verbindungen überhaupt erst erklärbar.³⁷

Die Blauverschiebung zeigt sich auch gut bei dem Farbstoff Coumarin 153 (Abbildung 2.12).

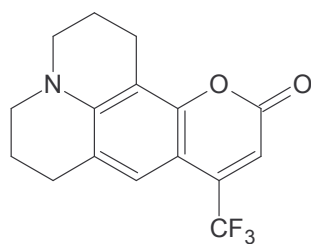


Abbildung 2.12 Strukturformel des Coumarin 153

Vergleicht man dessen UV-VIS-Spektrum mit den gemessenen Zweiphotonenabsorptionsquerschnitten, so ist die steigende Absorptionsfähigkeit bei einer ZPA hin zu kürzeren Wellenlängen deutlich zu erkennen (Abbildung 2.13).

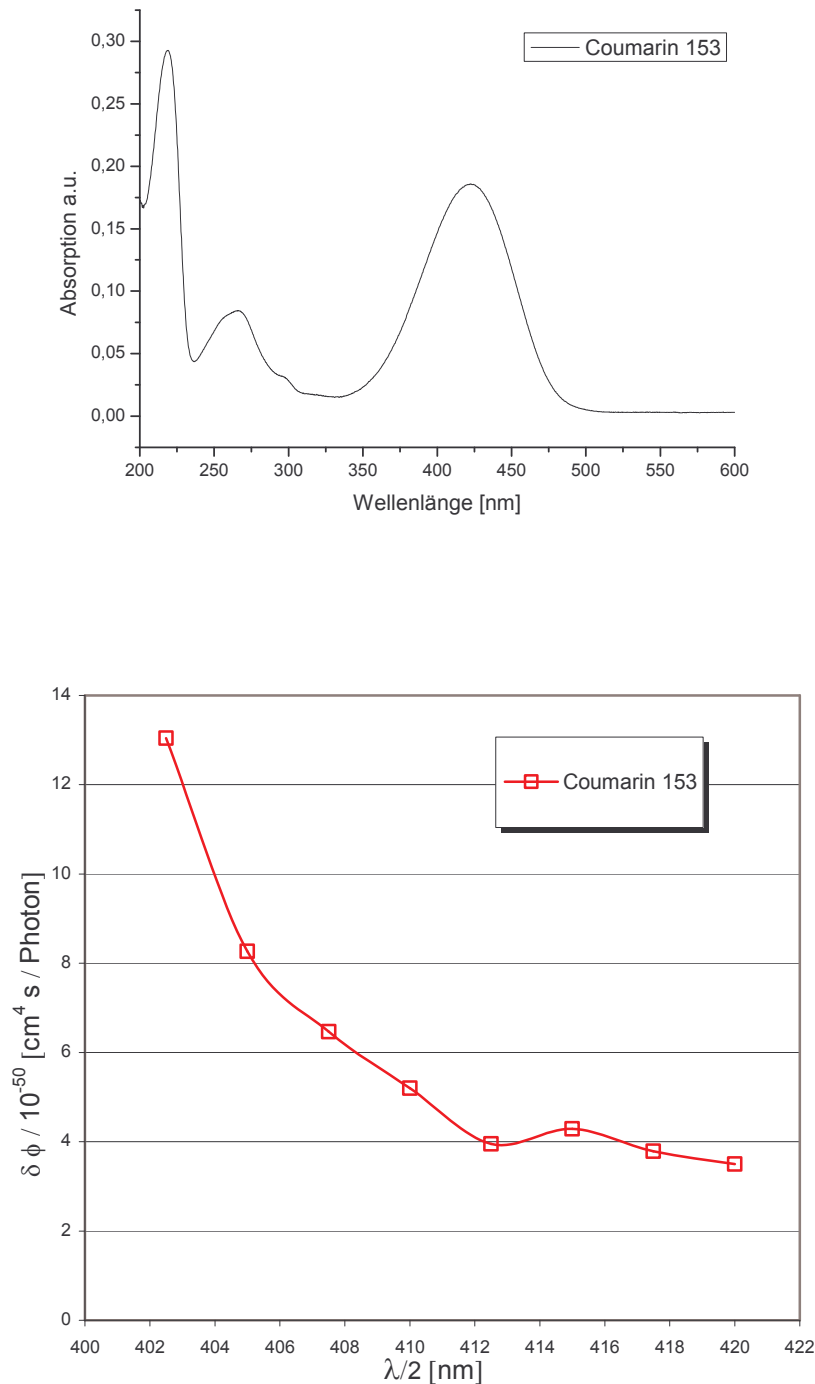


Abbildung 2.13 Blauverschiebung der Absorption bei einer ZPA. Das UV-VIS-Spektrum (oben) lässt eine gute ZPA bei etwa 850 nm vermuten, der maximale Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt ist aber durch vibronische Kopplungen blauverschoben (zum besseren Vergleich wurde gegen $\lambda/2$ aufgetragen).

Durch eine Dreiphotonenabsorption (z.B. bei 800 nm) lassen sich sogar Moleküle zur Fluoreszenz anregen, die im Ultravioletten absorbieren. Das in Abbildung 2.9 gezeigte Spektrum des p-Terphenyl wäre solch ein Fall. Jedoch ist die Anregungswahrscheinlichkeit um viele Größenordnungen kleiner, so dass ein Imagingverfahren mit Dreiphotonenanregung gegenwärtig an der zu geringen Fluoreszenzintensität scheitert.

Für Messungen innerhalb biologischer Zellen werden zusätzliche Anforderungen an den Farbstoff gestellt. Er soll eine geringe Toxizität aufweisen und in untoxischen Lösemitteln wie in Wasser oder ethanolischen Lösemitteln löslich sein. Außerdem muss er sich in die Zellen einschleusen lassen, d.h. er muss die Zellwand durchdringen können. Eine elegante Methode, Zellen zu untersuchen, ist die Ausnutzung der Fluoreszenz von natürlichen Zellbestandteilen. Neben bekannten Farbstoffen wie das Chlorophyll (auch Blattgrün) und Flavoproteinen können auch viele andere Zellbestandteile, wie z.B. die Elektronen-Carrier FAD oder das NAD(P)H, fluoreszieren. Solche fluoreszierenden Moleküle werden auch endogene Fluorophore genannt. Sie sind von besonderem Interesse, da direkte Fluoreszenzmessungen an diesen Fluorophoren ohne Eingriff in den biochemischen Haushalt des Systems und damit störungsfrei sind. Man spricht dann von non-labeling Experimenten.

Dem biologisch versierten Anwender bieten sich mittlerweile verschiedenste Farbstoffe auf dem Markt (Tabelle 2.3). Sie sind für verschiedene Aufgabenstellungen und gegebene Laserquellen geeignet. So können von einzelnen Zellbestandteilen bis hinzu Ionenkonzentrationen sehr viele Parameter fluoreszenztechnisch untersucht werden.

Tabelle 2.3 Verschiedene Farbstoffe für unterschiedlichste Imaginganwendungen von aktuellem Interesse in den Biowissenschaften (geordnet nach Anregungsmaxima)³⁸. Sie können je nach Anregungsquelle des Experiments und biologischer Fragestellung ausgewählt werden

Farbstoff	Anregungsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Indo-1	330 (high [Ca ²⁺]), 346 (low [Ca ²⁺])	401 (high [Ca ²⁺]), 475 (low [Ca ²⁺])
Fura-2 indicator	335 (high [Ca ²⁺]), 363 (low [Ca ²⁺])	505 (high [Ca ²⁺]), 512 (low [Ca ²⁺])
DAPI	358	461
Bimane	380	458
Cascade Blue dye	400	420
Cascade Yellow dye	402	545
Lucifer yellow CH	428	536
NBD amines	465	535
BCECF indicator	482 (low pH), 503 (high pH)	520 (low pH), 528 (high pH)
MitoTracker Green FM	490	516
Calcein	494	517
Rhodamine Green dye	502	527
Calcium Green indicators	506	533
Magnesium Green indicator	506	531
Rhodamine 123	507	529
Carboxy SNARF indicators	548 (low pH), 576 (high pH)	587 (low pH), 635 (high pH)
Calcium Orange indicator	549	576
Rhodamine Red dye	570	590
Calcium Crimson indicator	590	615

3 Materialien und Methoden

3.1 Prinzip des Experiments

Die hier verwendete Apparatur besteht aus zwei Kernkomponenten dem Laser und dem Mikroskop. Diese beiden sind durch eine Anzahl von optisch wirksamen Bauelementen (Spiegel, Strahlteiler, Graufilter, Polarisatoren, Teleskop,...) mit einander verbunden. Die Abbildung 3.1 zeigt solch einen Aufbau, mit einer Auswahl an optischen Bauelementen. In dieser Skizze wird der Vanadat-Diodenlaser (Verdi V10) den Ti:Sa-Laser pumpen. Das gepulste, infrarote Laserlicht wird über Spiegel gelenkt in einen so genannten Galvoscanner (x-y Rastereinheit) gelangen. Das gerasterte Laserlicht wird dann in ein Mikroskop gekoppelt, um die Probe zu untersuchen.

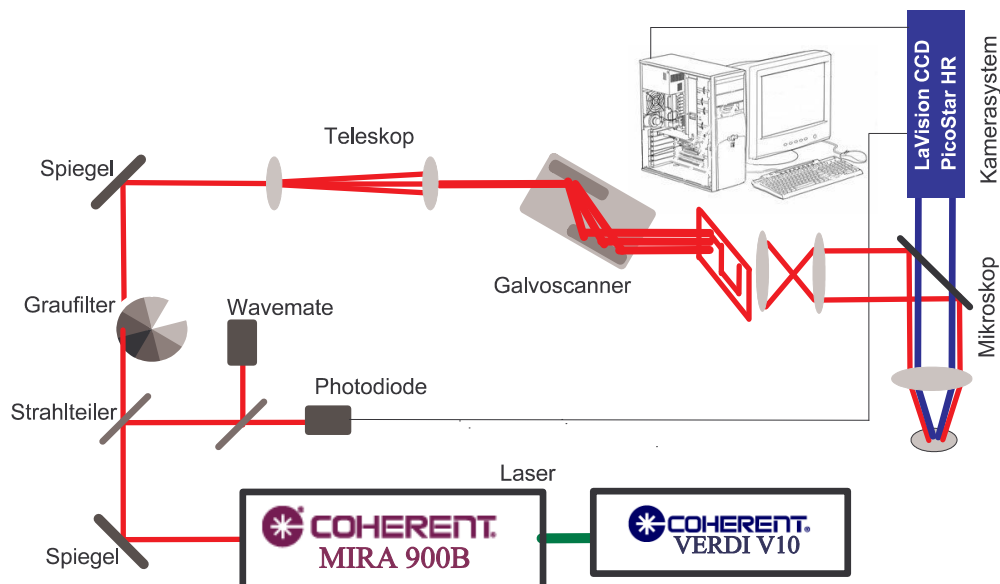


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Zweiphotonen-Laser-Rastermikroskops

Über 2 Strahlteiler wird ein Teil des Laserlichtes auf ein *Wavemate* zur Wellenlängenbestimmung und eine schnelle Photodiode gelenkt. Die Photodiode dient zum Triggern der Kamera,

so dass diese zum Zeitpunkt des Laserpulses ausgelöst werden kann. Ein Graufilter sorgt mit verschiedenen optischen Dichten für eine feinstufige Abschwächung des Laserlichtes, da die Leistung des Lasers für die meisten Anwendungen zu hoch ist. So ist für viele biologische Messungen eine mittlere Laserleistung von $\leq 10\text{mW}$ (innerhalb der Probe) ein Bereich unterhalb der Belastungsgrenze.³⁹

Fokus und Anregungsvolumen

Bevor das Licht in den Galvoscaner (X-Y-Rastereinheit) eintritt, wird der Strahldurchmesser mit einem Teleskopsystem aufgeweitet. Dies soll den späteren Fokus in der Probe verbessern. Dessen Radius w_0 hängt nach

$$w_0 = \frac{\lambda \cdot f}{\pi \cdot w_1} \quad (3.1)$$

von λ der Wellenlänge und w_1 dem Radius des Lichtstrahls vor der Fokussierung ab (f = Brennweite). Der ausgeleuchtete Bereich der Linse (hier Mikroskopobjektiv) soll also möglichst groß gehalten werden. Dies ist in Anbetracht der Anregungswahrscheinlichkeit von Bedeutung, da durch eine gute Fokussierung der Photonenfluss im Brennpunkt sehr hoch ist, und eine Zweiphotonenanregung gut durchgeführt werden kann. Die so genannte z-Auflösung wird hierdurch auch entscheidend beeinflusst. Erst ein gut ausgeleuchtetes Mikroskopobjektiv kann seine maximale Auflösung erreichen. Auflösung meint hier im Falle der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie die Ausdehnung des Anregungsvolumens. Da nur in dem Anregungsvolumen genug Intensität für die zweiphotonenbasierte Fluoreszenzanregung herrscht. Dieses Anregungsvolumen definiert sich aus einer Isofläche, dessen Grenzen entlang der optischen Achse durch den Wert $1/e$ der maximalen Anregungswahrscheinlichkeit begrenzt werden. Abbildung 3.2 skizziert den erläuterten Zusammenhang. Die Objektivlinse wäre in diesem Falle auch das Mikroskopobjektiv, man erkennt im unteren Bild das olivenförmige Anregungsvolumen (Rotationselipsoid). Die axiale Auflösung bei dem Zweiphotonenexperiment entspricht dem Δz in dieser Skizze. Sie wird natürlich auch von den Kennzahlen des Mikroskopobjektivs selbst beeinflusst. Neben der Vergrößerung gibt es die numerische Apertur, welche eine Kennzahl NA (auch oft mit A_N oder n.A. abgekürzt) für die Öffnung eines optischen Systems bei endlicher Objektweite ist. Sie beträgt

$$NA = n \cdot \sin u \quad (3.2)$$

(n Brechzahl des Stoffes vor dem System, u halber Öffnungswinkel) und bestimmt das Auflösungsvermögen eines Mikroskopobjektivs. Die direkte Abhängigkeit zwischen lateraler und axialer Auflösung wurde von SQUIER und MÜLLER⁴⁰ bei einer EPA zu

$$r_0 = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \text{ und } z_0 = \frac{2 \cdot n \cdot \lambda}{(NA)^2} \quad (3.3)$$

definiert. Wobei $2r_0$ und z_0 der lateralen bzw. axialen Auflösung des Systems entspricht. Bei einem ZPA-System werden diese Gleichungen durch die quadratische Leistungsabhängigkeit zu

$$r_0 \approx \frac{0,44 \cdot \lambda}{NA} \text{ und } z_0 \approx \frac{1,5 \cdot n \cdot \lambda}{(NA)^2} \quad (3.4)$$

korrigiert.⁴¹

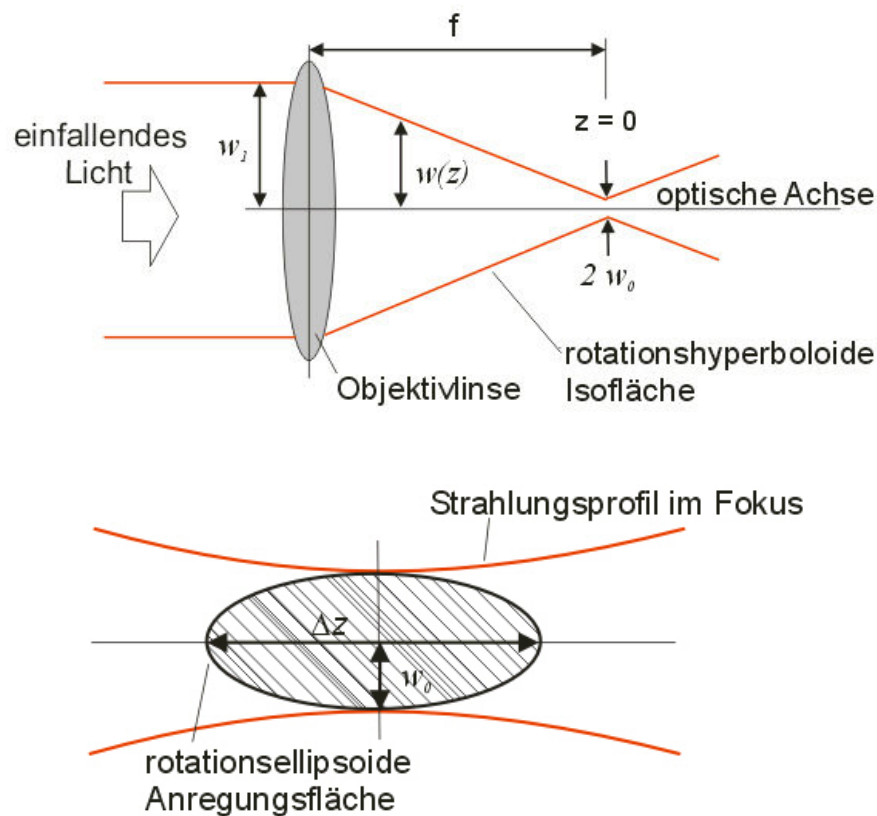


Abbildung 3.2 Strahlprofil durch eine Linse (oben) mit w_i dem Radius des einfallenden Lichtes und $2w_0$ dem Fokusdurchmesser. Unten die Anregungsfläche entlang der optischen Achse im fokussierten Laserstrahl mit der lateralen Ausdehnung Δz .

Als Beispiel wurde die Auflösung eines 63x Zeiss Achroplan NA 0,95 Wasserimmersionsobjektivs bei einer ZPA mit 800 nm bestimmt. Die gaußförmige Intensitätsausdehnung eines fokalen Punktes in einer fluoreszierenden Lösung ergab eine laterale Auflösung (Halbwertsbreite Abbildung 3.3) von ca. 677 nm.

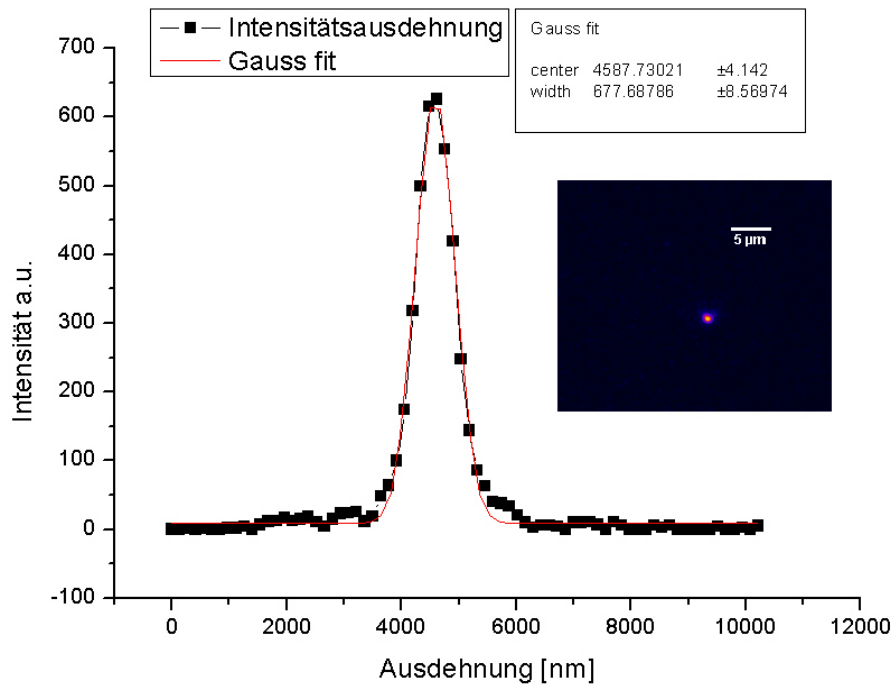


Abbildung 3.3 Laterale Auflösung eines 63x Zeiss Objektivs bei ZPA mit 800nm an einem 0,5 µm großen Microbead. Der Graph zeigt ein Intensitätsprofil mit Gaußfit durch den abgebildeten Microbead.

Für die axiale Auflösung wurde eine fluoreszierende, monomolekulare Schicht auf einem Objektträger benutzt. Beim Durchfahren dieser wenige Nanometer dicken Schicht mit dem Fokus wurde ebenfalls ein gaußförmiges Intensitätsprofil aufgenommen und eine axiale Auflösung von 2,1 µm bestimmt.

Das Lasermikroskop

Das Mikroskop ist ein Zeiss Axiostar Plus, welches ein aufrechtes Mikroskop mit rückwärtiger Einkoppelmöglichkeit für einen Lichtstrahl ist. Der Galvoscaner der Marke GSI Lumonics besitzt zwei Silberspiegel, die über Kommandozeilen angesprochen mit Rasterfeldern in gewünschter Form und Größe antworten. Dies erlaubt erst so genannte Imagingexperimente, da der Fokus und damit das Anregungsvolumen über der Probe lateral verschoben werden, und die Fluoreszenzinformation auf dem CCD-Chip der Kamera zweidimensional abgebildet wird. Das Kamerasystem, bestehend aus der LaVision Picostar HR und dem LaVision Imager mit einem 640x480 Pixel CCD-Chip, hat eine variable Verschlusszeit.

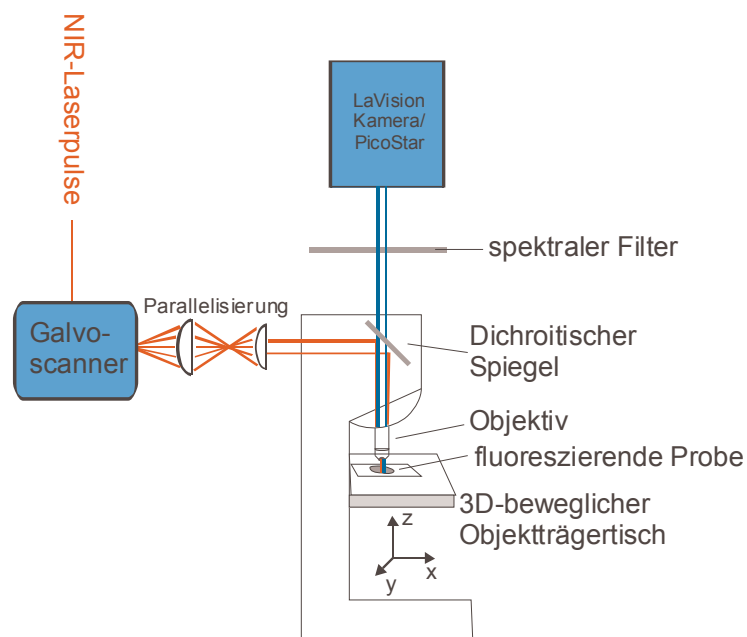


Abbildung 3.4 Schema des Laserrasterfluoreszenzmikroskops

Dieses Zeitfenster kann zwischen 200 und 1000 ps lang sein und mit Hilfe des Trigger-Generators (Kenntech Instruments) um 25 ps Schritte relativ zum Laserpuls verschoben werden. Der Aufbau und das Prinzip der Picostar ist hierbei für spätere Fragestellungen der Bildauflösung von Interesse. Dieser stellt sich im skizzierten Beispiel (Abbildung 3.5) wie folgt dar: Das Lichtsignal von der Probe schlägt an der Photokathode zunächst Elektronen aus, die in Richtung der MCP beschleunigt werden. An der MCP findet die Verstärkung statt. Die MCP ist eine Mikrokanalplatte mit Einzelkanaldurchmessern von ca. 10 μm . In diesen Kanälen werden die Elektronen durch Stöße mit der Wand vervielfacht. Das verstärkte Elektronensignal erzeugt an einem Phosphorschirm dann wiederum Photonen, die dann an der CCD der Kamera detektiert werden können.

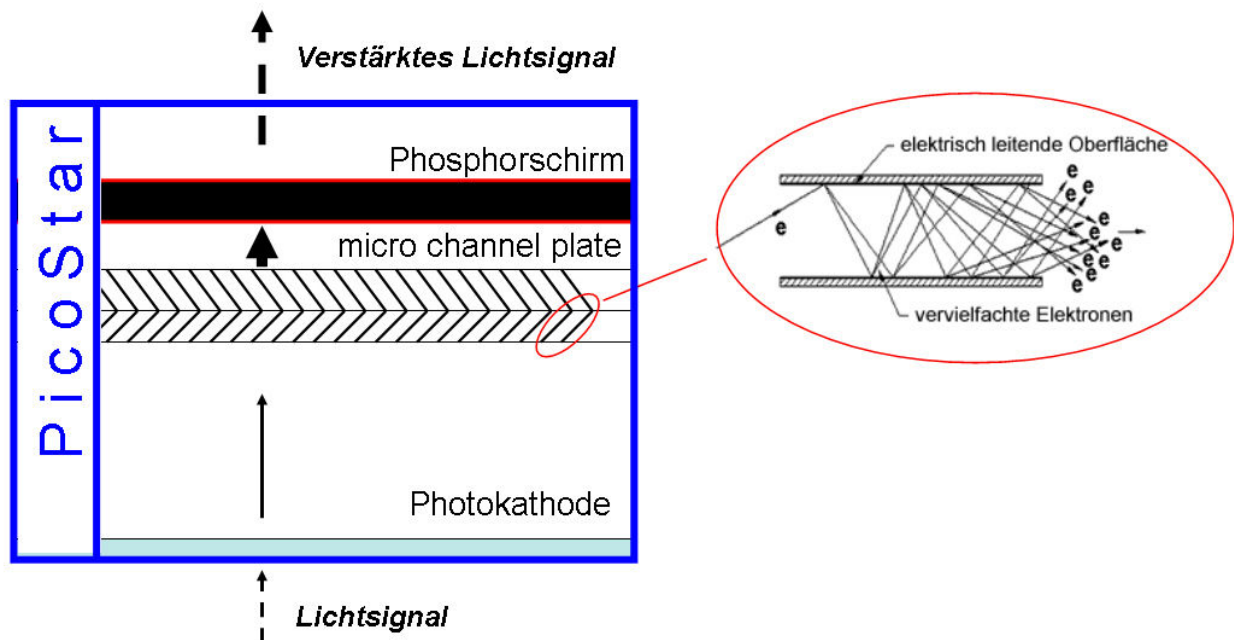


Abbildung 3.5 Schematischer Aufbau der LaVision PicoStar

Das Zeitfenster der Picostar erlaubt erst so genannte „time-domain“ Messungen mit denen man die Fluoreszenzlebensdauer bestimmen kann. Vor dem Kamera-System ist ein spektraler Filter positioniert, der zum einen Streulicht des Lasers blocken soll und zum anderen bei mehreren fluoreszierenden Spezies die Fluoreszenz nur einer Gewünschten durchlässt. So wird eine Fluoreszenzintensität innerhalb der Verschlusszeit aufsummiert, das Zeitfenster verschoben und erneut aufsummiert wobei die Verschiebung einen Minimalwert von 25 ps haben kann. Das Signal des CCD-Chips wird an das angeschlossene Computersystem weitergeleitet und mit Hilfe des Aufnahmeprogramms (DaVis 5.3 und 6.2, LaVision) visualisiert. Trägt man den Verlauf der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit auf, so erhält man eine Fluoreszenzabklingkurve (siehe Abbildung 3.6). Die Lebensdauer kann nach Gleichung (2.23) durch einen exponentiellen Fit erster Ordnung berechnet werden. So ergibt sich an diesem Beispiel eine Lebensdauer von 2999 ± 79 ps.

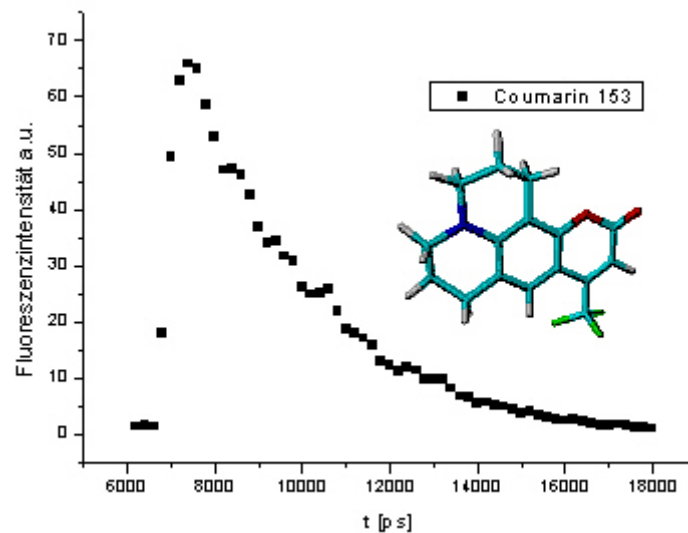


Abbildung 3.6 Fluoreszenzabklingkurve für den Farbstoff Coumarin 153

Eine Ergänzung der Apparatur kann durch ein so genanntes TrimScope durchgeführt werden (Kap. 3.3). Hier wird der Laserstrahl durch geschickte Strahlführung mit optischen Bauelementen aufgespalten, so dass die gleiche Fläche in schnellerer Zeit mit der gleichen Intensität abgerastert werden kann.

Zu erwähnen wäre noch ein anderes Verfahren zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer. Bei der so genannten „frequency-domain“ Methode ermittelt man die Phasenverschiebung der Fluoreszenz bezüglich der sinusförmig modulierten Anregungsquelle und daraus die Lebensdauer der Emission.^{42, 15} Ein Vergleich der beiden Methoden bezogen auf das Imagingverfahren zeigt, dass die frequency-domain Variante bei schwachen Fluoreszenzquellen ein schlechteres Signalrauschverhältnis bietet.⁴³

3.2 Rendern von Fluoreszenzlebensdauerbildern (FLIM)

Neben den Intensitätsbildern bietet dieser spezielle Aufbau noch eine besondere Möglichkeit; das Aufnehmen bzw. Berechnen von Bildern, an denen man die Fluoreszenzlebensdauer direkt ablesen kann, den so genannten FLIMs (engl. Fluorescence Lifetime Images). In Gleichung (2.23) wird die Intensität einer Fluoreszenz und dessen Lebensdauer beschrieben. Betrachtet man ein Intensitätsbild, welches mit dem Laserrastermikroskop aufgenommen wurde, so kann man dieses Bild als eine große Matrix betrachten, in der die einzelnen Pixel je einem Matrix-

element mit einer entsprechenden Fluoreszenzintensität entsprechen. Folglich wird das aufgenommene Bild als Textfile gespeichert, um die numerische Bearbeitung durchzuführen.

Um das Signalrauschen der Kamera zu minimieren, können die aufgenommenen Intensitätsmatrizen für die jeweiligen Zeitfenster nachträglich mit einem 2 x 2 Pixel umfassenden Gaußfilter bearbeitet werden.

Nimmt man nun einen Stapel an Fluoreszenzbildern in äquidistanten Zeitabständen nach dem Anregungspuls auf, so kann nach Gleichung (2.23) eine Lebensdauer für jedes einzelne Matricelement (Pixel) berechnet. So wird aus einem Satz an Intensitätsbildern ein FLIM.

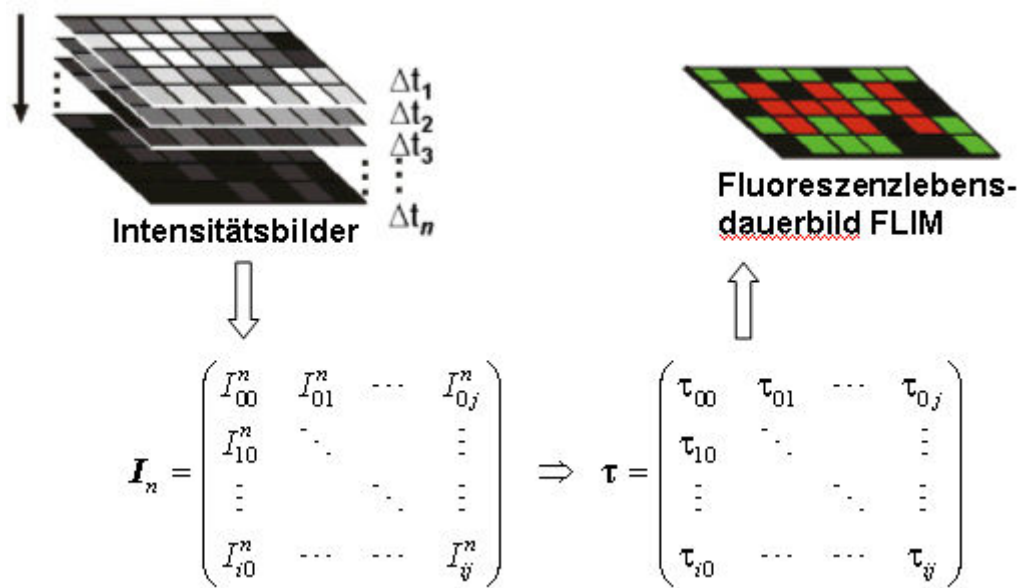


Abbildung 3.7 Rendern eines FLIM aus Intensitätsbildern

Falls sich nun in diesen Intensitätsbildern zwei unterschiedlich lang fluoreszierende Spezies verbergen, können diese aus diesem Satz an Intensitätsbildern mit Hilfe der vorgestellten PRO-NY-Methode zwei FLIMs erzeugt werden, die jeweils die verschiedenen Lebensdauern repräsentieren.

3.3 Das TrimScope

Eine Erweiterungsmöglichkeit des Zweiphotonenlasermikroskops ist das TrimScope. Dies ist ein optischer Aufbau, der es ermöglicht, den Laserstrahl in vielfache parallel laufende Laserstrahlen aufzuspalten. Solch ein Aufbau wurde das erste Mal durch NIELSEN et al. an der Uni-

versität Bielefeld verwirklicht (durch LaVision Biotech zur Serienreife geführt) und steht in der GBF in Braunschweig zur Verfügung.⁴⁴ Das TrimScope arbeitet mit einer speziell beschichteten Komponente (ein länglicher Glasblock), die den einfallenden Laserstrahl zu 50% reflektiert und zu 50% durchlässt (siehe Abbildung 3.8). Die reflektierten und transmittierten Laserstrahlen werden durch eine präzise Spiegelanordnung so geführt, dass sie das TrimScope in nahezu gleicher Güte verlassen.

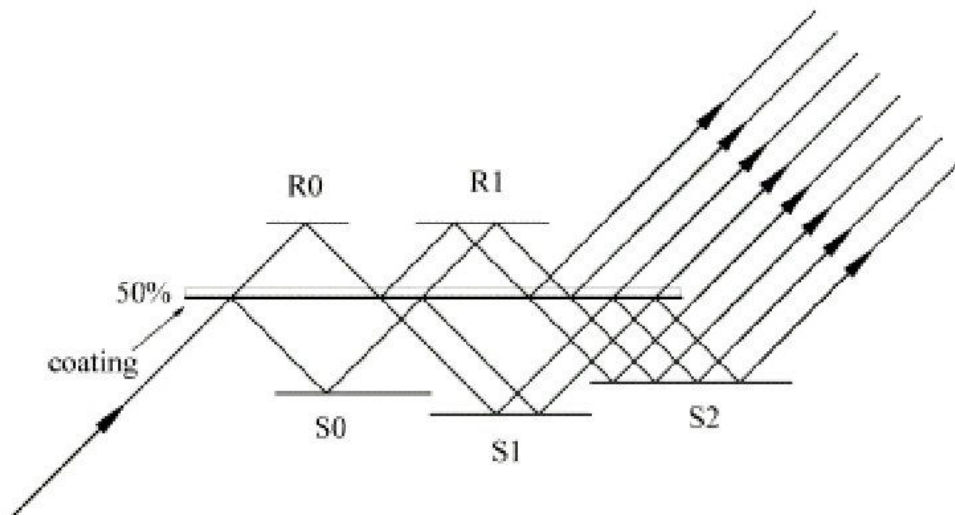


Abbildung 3.8 Prinzip des TrimScopes. In der Mitte ein optisches Bauelement mit einer speziellen Beschichtung. R und S sind jeweils total reflektierende Spiegel.⁴⁴

Dadurch, dass der halbtransparente Glasblock zwischen die Spiegel rein- und rausgefahren werden kann, ist es möglich den Laserstrahl in 2, 4, 8, 16, 32 bzw. 64 gleiche Strahlen aufzutrennen, ohne nennenswerte Verluste in Kohärenz und spektralen Eigenschaften zu erleiden. In Abbildung 3.9 sind 32 parallele Laserstrahlen in einen Fluoreszenzfarbstoff fokussiert. Man erkennt die Äquidistanz und homogene Intensitätsverteilung der Strahlen. Durch weitere 32 Strahlen, die zwischen den gezeigten lägen, wäre eine nahezu lückenlos fluoreszierende Linie erzeugt. Der Vorteil solch einer Laserstrahlvervielfachung zu einer Linie, besteht in der Möglichkeit eine bestimmte Fläche auf der zu untersuchenden Probe mit der gleichen Intensität in einer kürzeren Zeit zu scannen. Dadurch sinkt die Aufnahmezeit für schwach fluoreszierende Quellen, die man im Einzelstrahlbetrieb durch längere Belichtungsdauer der Kameraeinheit hätte. Gerade bei endogenen Fluorophoren wie dem NADPH, die eine schwache Fluoreszenz zeigen, lassen sich so die Aufnahmezeit extrem verkürzen. Abbildung 4.4 zeigt solch ein Intensitätsbild der NAD(P)H-Fluoreszenz einer MIN6 β -Zelle (vgl. Kap. 3.4), welches mit Hilfe eines TrimScopes aufgenommen wurde.

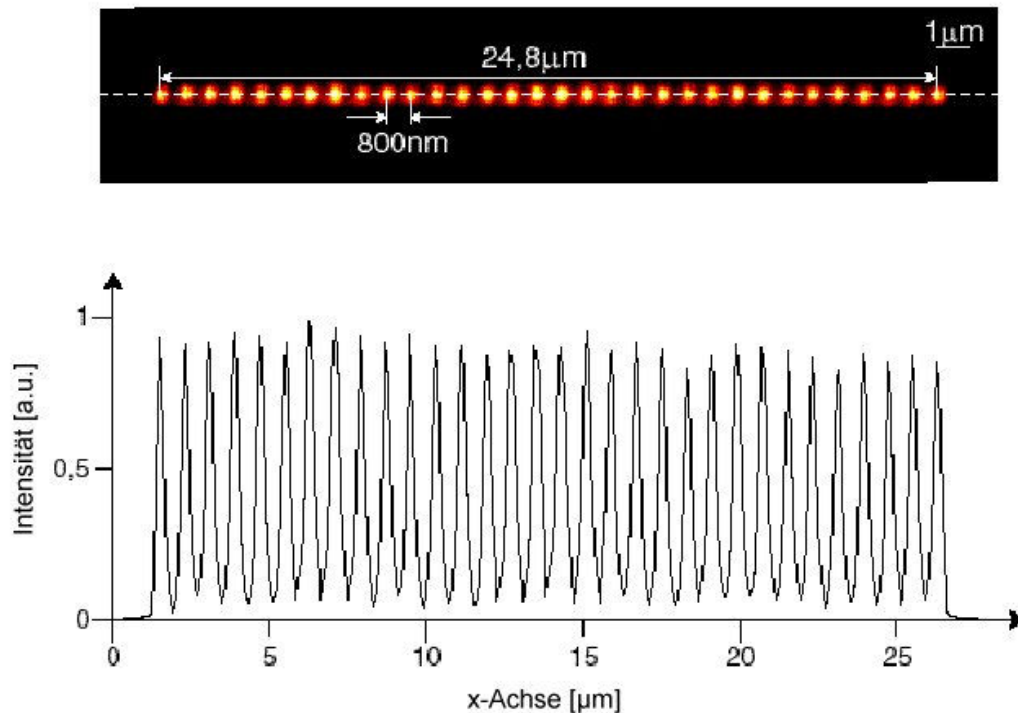


Abbildung 3.9 32 Foki eines TrimScopes in einer fluoreszierenden Probe (20x Objektiv, NA=0,95). Durch Zuschalten weiterer 32 wäre eine fluoreszierende Linie erzeugt, die schnell über die Probe bewegt werden kann.

3.4 Biologische Proben

In dieser Arbeit werden unterschiedliche biologische Proben genutzt, um an diesen neue Methoden für die 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie zu erforschen. Zu diesen gehören unter anderem insulinproduzierende Zellen. Insulin kann als eines der wichtigsten anabolen Hormone für die Regulation von Substrataufnahme und Speicherung in verschiedenen Geweben angesehen werden. Ein Mangel an Insulin ist verantwortlich für das Krankheitsbild des Diabetes mellitus, das schon in den antiken Papyri der Ägypter ihre genaue Beschreibung fand. Erstmals konnte das Insulin 1923 von BANTING und BEST aus Rinderpankreas für den therapeutischen Einsatz angereichert werden. Mittlerweile ist bekannt, dass das Schweineinsulin die größte Ähnlichkeit mit dem Humaninsulin besitzt. Die β -Zellen in denen die Insulinbiosynthese abläuft, machen über dreiviertel der Zellmasse der nach LANGERHANS benannten Inseln auf der Pankreas aus.⁴⁵

Neben ganzen Pankreas-Inseln (entnommen aus Mäusen) wurde in dieser Arbeit eine Zelllinie der MIN6 β -Zellen verwendet, diese wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rustenbeck aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU-Braunschweig zur Verfügung gestellt und im weiteren Verlauf eigenverantwortlich weiterkultiviert.

Die 3D-Hautkonstrukte, die in dermalen pH-Messungen auf Ihre Dermisäquivalenz geprüft werden sollten, wurden von der AG Prof. Dr. Müller-Goymann aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie der TU-Braunschweig bereitgestellt.

3.4.1 MIN6 β -Zellen

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die von Insulinomen transgener Mäuse gewonnen ist. Sie eignet sich hervorragend für die mechanistische Untersuchung der Insulinsekretion. Bei einem gegebenen biologischen Stimulus, wie z.B. Umströmung mit verschiedener Glucose- oder Kaliumkonzentration⁴⁶, soll die Reaktion auf Einzelzellenebene beobachtet werden.

Morphologie

Die Morphologie der β -Zellen ist abhängig davon, ob sie an einer Oberfläche (z.B. Boden der Zellkulturflasche) anhaften oder in ihrem Kulturmedium suspendiert sind. Letzteres liegt direkt nach der Trypsinierung vor, wenn die Zellen abgelöst und neu ausgesät wurden. In suspendierter Form haben die Zellen eine rundliche Gestalt, nach dem Aussäen in ein Kulturgefäß verändern sie ihr Aussehen. Nach etwa einem Tag zeigen die Zellen schon unregelmäßig gezackte Ränder. Nach weiteren 3 bis 4 Tagen ist ein dichter Zellrasen zu erkennen.

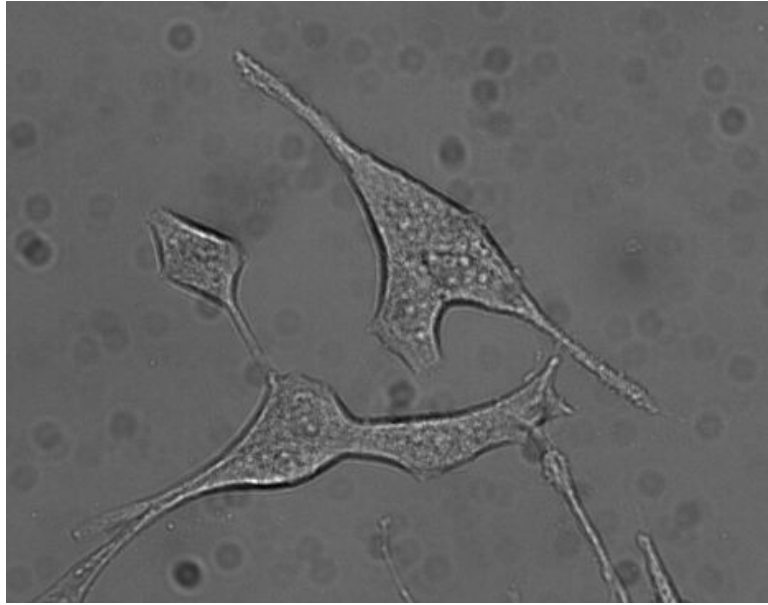


Abbildung 3.10 MIN6 β -Zellen (Durchlichtaufnahme)

Benutzte Geräte

Die Inkubation der Zellen geschah in einem Brutschrank der Firma Sanyo (MCO-18AIC, inkl. UV-Dekontaminationsroutine), worin eine Temperatur von 37°C herrschte. Der CO₂-Gehalt der Luft war konstant bei 5% mit einer rel. Luftfeuchtigkeit von 95%. Für sterile Bedingungen bei der Arbeit mit den Zellen sorgte eine Heraeus Arbeitsbank (LaminAir® HLB 2448). Die für die Kultivierung benutzten Nährmedien und Lösungen wurden vor Ihrem Einsatz auf 37°C vorgewärmt. Für die optische Kontrolle des Zellwachstums wurde ein inverses Nikon-Mikroskop (Eclipse TS100) mit Phasenkontrastoptik benutzt.

Zellkultivierung

Die MIN6 β -Zellen wurden in Gewebekulturflaschen und für die Messung jeweils auf entsprechenden Mikroskopdeckgläschen kultiviert. Bei Feststellung eines zusammengewachsenen Zellrasens, wurden die β -Zellen passagiert. Dies bedeutet das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche und das Aussähen in eine neue Zellkulturflasche, was Erfahrungsgemäß alle 8 bis 10 Tage notwendig war.

3.4.2 Umströmungskammer für die MIN6 Zellstimulierung

Die vorgestellten Zellen sollen bei den Messungen höchstmögliche Vitalität vorweisen, um die hier gewonnenen experimentellen Ergebnisse auf biologische Aussagen gut übertragen zu können. Hierzu sollten sie unter Bedingungen, wie sie auch im Körper bzw. im Zellinneren normalerweise vorkommen, vermessen werden. Ähnlich wie Chemiker von Standardbedingungen, sprechen Biochemiker hier von quasi-physiologischen Bedingungen. Dabei ist unter anderem eine Temperatur von 37°C und ein pH von 7,4 zu verstehen. Für die Zellatmung ist zudem eine Begasung aus einem Gemisch von 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid (bekannt als Carbogengas) von Vorteil. Um diese physiologischen Bedingungen während der Messung halten zu können, wurde eine speziell für unsere Mikroskopiezwecke geeignete Umströmungskammer entwickelt. Sie besteht im Grundkörper aus gefärbtem Acrylglas und hat eine kleine Kammer. Auf diese Kammer werden die biologischen Proben, die man auf geeigneten Deckgläschen aufwachsen lässt, umgedreht aufgesetzt. Durch die nun geschlossene Kammer kann geeignetes Medium, dass die Voraussetzungen erfüllt (Temperatur, pH-Wert, Nährstoffe) hindurchfließen, und sorgt für annehmbare Bedingungen für die biologischen Proben.



Abbildung 3.11 Prototyp einer Zellumströmungskammer für Mikroskopiezwecke. Hier kann ein geeignetes Medium die biologische Probe umströmen und für physiologische Bedingungen sorgen.

Das zellumströmende Medium bestand hier aus einem Krebs-Ringer-Hepes-Puffer folgender Zusammensetzung: 118,3 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 3,4 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM MgSO₄, 20,3 mM NaHCO₃ und 3,1 Vol% Hepes-Albumin. Die „Standard“-Krebs-Ringer-Lösung hat eine 5 mM Glucosekonzentration, jedoch wurden für Stimulationsversuche auch glucosefreie Krebs-Ringer-Lösungen hergestellt, um von dieser auf eine Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucosekonzentration zu wechseln. Da die Insulinsekretion von der extra-

zellulären Glucosekonzentration abhängt, ist diese Möglichkeit des physiologischen Reizes wichtig. Ebenso hängt diese von der Aufrechterhaltung einer physiologischen Calciumkonzentration ab. Die Insulinsekretion beginnt bei gesunden Zellen ab einer Glucosekonzentration von etwa 2-3mmol/l und nimmt bis zu einem Grenzwert von etwa 15 mmol/l mit steigender Konzentration zu.⁴⁵ So ist bei Versuchen in der Umströmungskammer gewährleistet, dass ein adäquater physiologischer Reiz für die Insulinsekretion herbeigeführt werden kann, um diese dann mit den entwickelten Methoden näher zu analysieren.

3.4.3 3D-Hautkonstrukte

Die steigende Lebenserwartung der Menschen in den letzten Jahrzehnten in den Industrienationen hat zu einem „wachsenden“ Bedarf an permanenten oder temporären Ersatz von erkrankten, verletzten oder gealterten Organen und Geweben geführt. Dieses stellt eine der großen Herausforderungen an die moderne Medizin dar. Die regenerative Medizin umfasst unter anderem auch Entwicklungen und Anwendungen im Bereich des so genannten Tissue Engineering*. Wurden schon zu Beginn des 19. Jahrhunderts erste Versuche beschrieben, künstliche Gewebe zu züchten und zu verpflanzen, gelang es den Forschern doch erst Mitte der 1970er Jahre, im Labor Hautzellen künstlich herzustellen. Seitdem ist die Forschung in diesem Gebiet immens vorangeschritten und es werden mittlerweile viele Gewebetypen nachgeahmt.⁴⁷ Ein wichtiger Aspekt bei den Hautkonstrukten ist die Gewährleistung der Aufrechterhaltung physiologischer Parameter (z.B. des pH-Wertes) über einen langen Zeitraum.

An dieser Stelle werden 3D-Hautkonstrukte beschrieben, die im späteren Verlauf auf Ihre Eignung als Hautäquivalente in Bezug auf Ihren „sauren“ Charakter geprüft werden. Diese bestehen aus einem Dermis- und Epidermisäquivalent, welche vereinigt und weiterkultiviert werden. So werden die Dermisäquivalente zunächst durch Einsaat von humanen primären Fibroblasten in ein Kollagengel aufgebaut. Das Kollagengel wurde zuvor aus Rattenschwänzen extrahiert. Die Epidermisäquivalente wurden unter Zuhilfenahme der HaCaT-Zelllinie gezüchtet. Bei dieser Zelllinie wurden epidermale Keratinozyten von erwachsenen Hautspen-

* Der Begriff Tissue Engineering wurde auf einer Konferenz der National Science Foundation 1988 wie folgt definiert: „...the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationship in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, remain or improve tissue function“.⁴⁷

dern (Human aadult) genutzt, um diese in einem speziellem Medium (low Calcium concentration) bei erhöhter Temperatur (elevated Temperature), spontan mutieren zu lassen. Diese werden dann in ihrer 80. – 120. Passage auf das Dermisäquivalent aufgesät. Dieses aufgebaute 3D-Hautkonstrukt bildet dann bei geeigneter Kultivierung ein mehrlagiges Stratum corneum aus, bis hin zur Entwicklung einer abgestorbenen Hornschicht, die die eigentliche Schutzbarriere für die Haut darstellt.

Morphologie und Charakterisierung

Die gleichartige Morphologie der Hautkonstrukte im Vergleich zu Hautexzidaten wurde mikroskopisch dokumentiert. So sind neben dem Stratum corneum auch die für die Regeneration der Haut verantwortliche Basalzellenschicht (Stratum basale) sowie das Stratum granulosum vorhanden und selbst zellspezifische Proteine wie Keratin und Laminin konnten nachgewiesen werden.

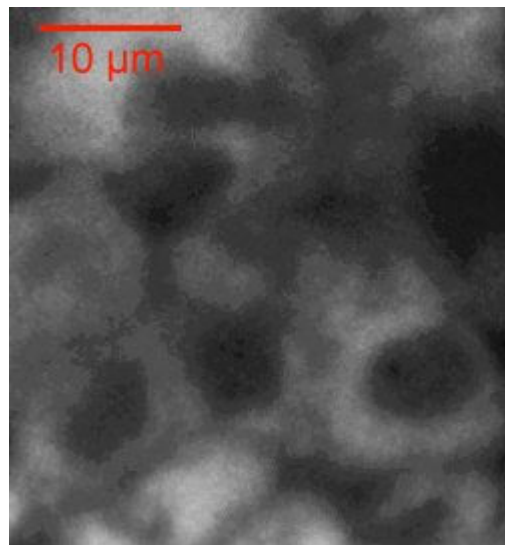


Abbildung 3.12 3D-Hautkonstrukt⁴⁸ (links) und Fluoreszenzbild (rechts) in 20 µm Tiefe (Stratum granulosum) angefärbt mit Rhodamin 6G

Ein Vergleich im Hinblick auf die Barrierefunktion wurde in Permeationsstudien gemacht.⁴⁹ Hier konnte eine ähnlich gute Ausbildung einer Barrierefunktion wie bei in vivo gewachsener Haut gezeigt werden.

Anfärbung

Die Hautkonstrukte werden für ihre spätere Vermessung mit den entsprechenden Fluorophoren angefärbt, die sich spezifisch in Bezug auf bestimmte Zellparameter verhalten (z.B. das Coumarin 153 für Brechungsindexmessungen oder das BCECF für die pH-Messungen). Hier-

zu werden wenige ml einer 10 bis 200 μM Farbstofflösung (wässrige bzw. ethanolische Lösung) auf das Hautkonstrukt gegeben. Die Anfärbezeit lag zwischen drei und sechs Stunden, konnte aber auch durch Zugabe von ein paar Tropfen DMSO beschleunigt werden.

4 Imagingtechniken

Bildgebende Verfahren werden in der Biologie und Medizin immer wichtiger. Mit diesen so genannten Imagingverfahren, werden die Gesamtheit der apparativen Verfahren bezeichnet, die zur Visualisierung medizinischer Befunde und damit letztendlich der physikalisch-chemischen Phänomene dienen. Seit den ersten Röntgenaufnahmen an Menschen um 1895 herum, welche als erste bildgebende Verfahren in der Medizin bezeichnet werden dürfen, wurden diese stetig weiterentwickelt.

In der geometrischen Optik oder der Fotografie ist ein Bild die optische Reproduktion der Wirklichkeit. Es steht repräsentativ für das zu beobachtende Objekt. Dabei wird ein Bild, wie es vom menschlichen Auge wahrgenommen wird, z.B. diese Seite der Dissertation, auf der Netzhaut abgebildet und in Nervenimpulse umgewandelt. Das Gehirn vermag es, ein qualitatives Urteil über diese Bildinformation zu fällen. Muss jedoch ein präzises, quantitatives Urteil gefällt werden, so erfordert dies die Hilfe von speziellen Auswerteverfahren. Für die mikroskopische Beobachtung der Fluoreszenzintensität trifft dies in besonderem Maße zu. Seit dem es den Computer als Gebrauchsgut gibt, wurden computergestützte Auswertemethoden konsequent weiterentwickelt. Immer „intelligendere“ Software und die nicht enden wollende Rechenstärke, erlauben heutzutage Auswertungen und dreidimensionale Rekonstruktionen (so genanntes 3D-Rendering) mit enormen Geschwindigkeiten.

Die Zweiphotonenmikroskopie besticht durch ihre Fähigkeit, biologische Proben nicht- oder minimalinvasiv beobachten zu können. Anders als in der Durchlichtmikroskopie kann man hier optische Schnitte durch ein biologisches Gewebe oder eine Zelle visualisieren, ohne diese zuvor mit einem Mikrotom in lichtmikroskopische Schnitte zerlegt zu haben. Aufgrund des sehr kleinen Anregungsvolumens haben die einzeln aufgenommenen Ebenen eine Dicke von etwa 1 bis 2 μm (intrinsische Tiefenauflösung). Mit einem motorisierten Mikroskoptisch können so, in Abständen von einigen Mikrometern, einzelne Bilder aufgenommen und zu einem dreidimensionalen Bild gerendert werden. Dabei gibt es für das Fluoreszenzimaging eine Fülle von Farbstoffen, die man zum Anfärben von Zellen oder nur Zellbestandteilen nutzen kann (vgl. Tabelle 2.3). Darunter sind verschiedene Coumarin- und Rhodaminderivate. Das Rhodamin 123 ist z.B. ein gern genutzter Farbstoff, um speziell Mitochondrien in Zellen anzufär-

ben (ein sog. Mitotracker).^{50, 51} Für die Zellkerne und die aus einer Doppellipidschicht bestehende Zellmembran können wiederum verschiedene so genannte Labeling-Kits genutzt werden, darunter die bekannten Alexa Fluor® Farbstoffe. Das Einbringen von Farbstoffen in biologische Systeme kann jedoch Messungen von biologischen Parametern beeinflussen. Aus diesem Grund erleben Autofluoreszenzmessungen von so genannten endogenen Fluorophoren als „non-labeling-Experimente“ einen starken Aufschwung. Schauen wir uns die Möglichkeiten der aufgebauten und oben vorgestellten Apparatur näher an, so sind die Wichtigsten wie folgt darzustellen: Intensity-Counting und Mapping, Parameter-Mapping und das 3-D Imaging. Die folgenden Ergebnisse dieser Aufnahmetechniken zeigen den Stand von Wissenschaft und Technik auf dem Gebiet des Fluoreszenzimagings.

4.1 Intensity-Counting und Mapping

Hierbei werden die Fluoreszenzsignale der Probe als direkte Intensitätsbilder auf dem CCD-Chip der Kameraeinheit abgebildet. Die Intensität in diesen Falschfarbenbildern kann sehr präzise unterschieden werden.

Es wurde ein Lymphknoten präpariert und mit dem Farbstoff CFSE gefärbt, der für allgemeine Proliferationsuntersuchungen genutzt wird, um z.B. Wachstumsprozesse zu beobachten. Der Farbstoff kann unter Abspaltung einer Succinimidylgruppe an Lysin- und Argininreste cytoplasmatischer Proteine koppeln. Die Färbung kann hierbei „vererbt“ werden und bleibt mehrere Wochen erhalten.⁵² Abbildung 4.1 zeigt das Intensitätsbild dieses Lymphknotens mit, für die Immunabwehr wichtigen, T-Zellen. Bei diesen Counting- und Mappingverfahren können regionale Intensitätsunterschiede verschiedene Fragen beantworten. Die Kombination verschiedener Farbstoffe und die Trennung der Fluoreszenzsignale verschiedener Wellenlängen mit optischen Breitbandfiltern und das erneute Überlagern mit verschiedenen Farbschemas können zur Diagnostik genutzt werden. So können z.B. krankhafte Zellen mit Farbstoffen, die sich vermehrt in diesen anlagern, durch solche Messungen lokalisiert werden.

Intensitätsaufnahmen können auch für Konzentrationsbestimmungen im Nano- und Mikromolaren Bereich herangezogen werden. Hierfür müssen allerdings Laserleistung und Geräteparameter an der Detektionseinheit stetig kontrolliert werden, da diese die registrierte Fluoreszenzintensität beeinflussen. Benutzt man hingegen spezifische Farbstoffe, die sich z.B. nur an Mitochondrien in Zellen anlagern, so können diese punktuellen Intensitäten direkt eine quali-

tative Aussage über deren Lage machen. Hier reicht schlichtweg die erhöhte Intensitätsdifferenz.

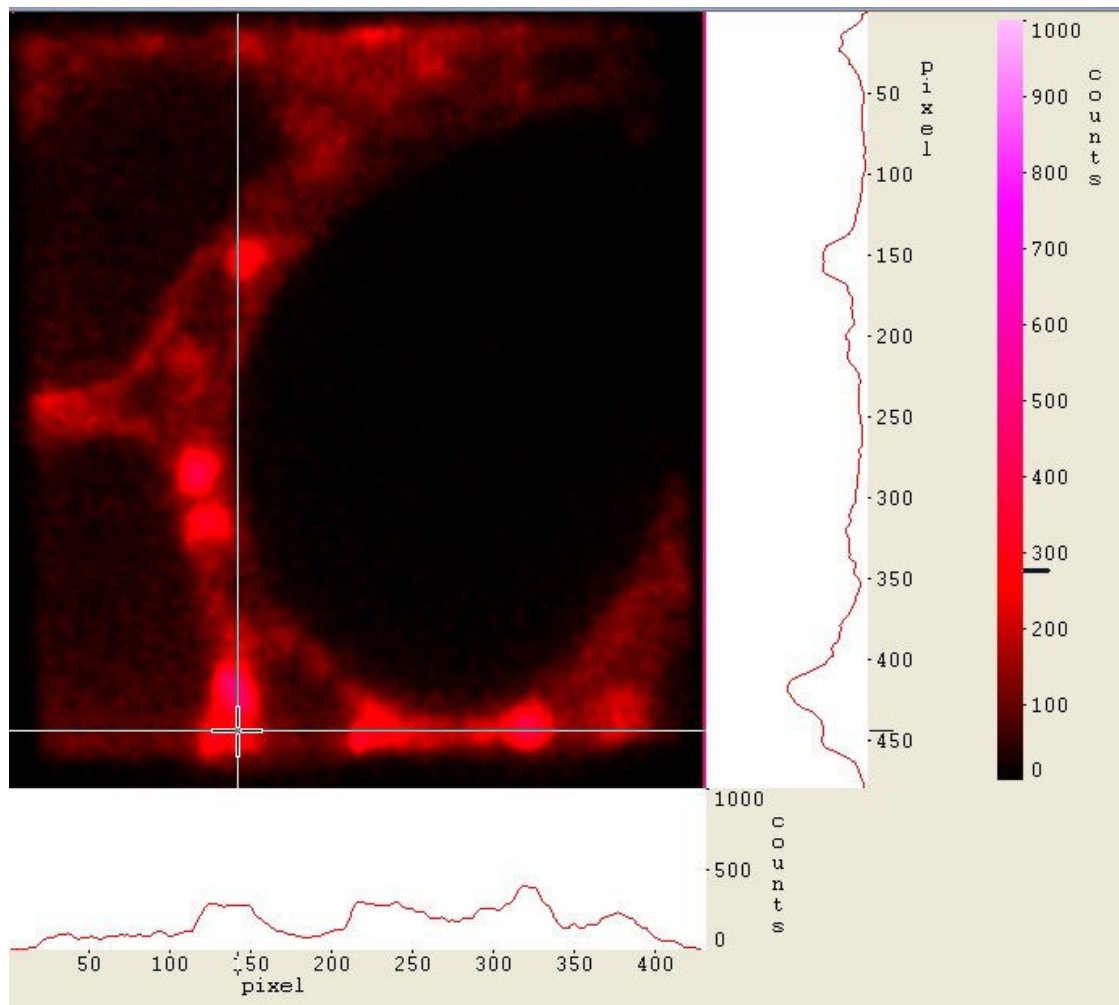


Abbildung 4.1 Fluoreszenzaufnahme eines Lymphknotens mit hell fluoreszierenden T-Zellen. Computergestützte Ortung erhöhter Fluoreszenzintensität in x-y-Richtung innerhalb einer Ebene (hier die Fluoreszenz von CFSE).

4.2 Parameter-Mapping

Messungen der Fluoreszenzlebensdauer hingegen sind durch ihren kalibrierfreien Charakter weniger problematisch. Aufnahmen dieser Art werden von Effekten wie Photobleichung, Streuung des Anregungslichtes in der Probe und Konzentrationsschwankungen kaum beeinflusst. Das in Kapitel 3.2 vorgestellte Verfahren für FLIM-Aufnahmen wird in Abbildung 4.2 demonstriert.

Hier wurde eine HDF-Zelle mit DBT8 angefärbt; einem speziell synthetisierten Farbstoff, der eine Affinität gegenüber Zellkern und Zellmembran zeigt.¹ Durch Bindung an diese verändert der Farbstoff sein Fluoreszenzverhalten. In dem τ -Map (in Anlehnung an das τ für die Fluoreszenzlebensdauer) ist dies deutlich durch erhöhte Lebensdauerzeiten an diesen Regionen zu erkennen. Diese resultieren aus geänderten Relaxationsprozessen des Farbstoffs durch Lipid- bzw. Proteinwechselwirkungen an den entsprechenden Stellen. Die Skalierung zeigt hier nicht mehr die Intensität, sondern direkt die Fluoreszenzlebensdauer in jedem einzelnen Pixel. Dieses Bild wird aus vielen einzelnen Intensitätsbildern, die in äquidistanten Zeitabständen nach dem Laserpuls registriert wurden, berechnet. Bei solchen FLIM-Aufnahmen ist eine ganz andere Informationsqualität vorhanden. Zwar wird die Fluoreszenzlebensdauer einer Spezies weder von Laserleistungsschwankungen noch lokalen Konzentrationsänderungen beeinflusst, wohl aber von einigen anderen Parametern.

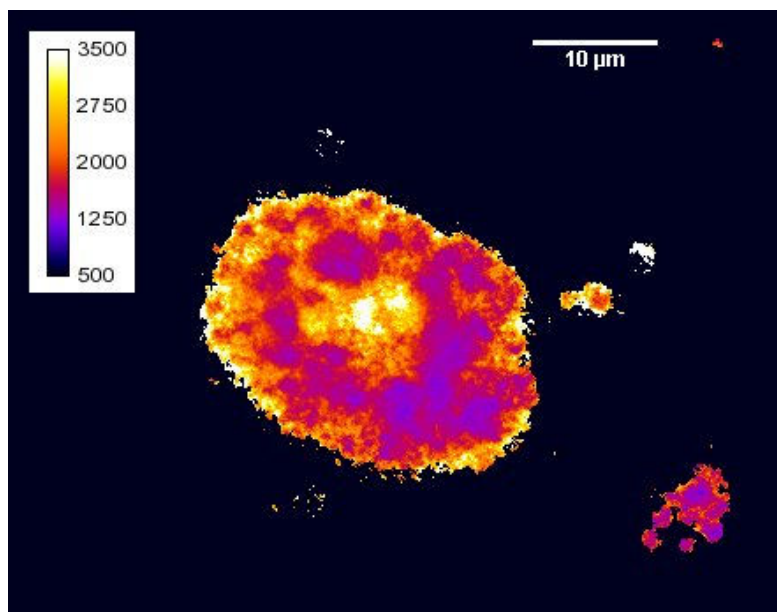


Abbildung 4.2 FLIM-Aufnahme einer HDF-Zelle, die mit DBT8 angefärbt wurde. Die Skalierung gibt die Fluoreszenzlebensdauer in Pikosekunden wieder.

Wir erinnern uns an Kapitel 2.4.1, wo diese Parameter wie pH-Wert, Brechungsindex, Viskosität, Polarität der Umgebung und direkte interionische bzw. intermolekulare Wechselwirkungen genannt wurden. Es kommt selten vor, dass sich viele dieser Parameter gleichzeitig in einem System ändern, so dass einer von ihnen bei konstanten Bedingungen für die übrigen bestimmt werden kann. Es gibt z.B. spezielle Farbstoffe, die mit einer veränderten Fluoreszenzlebensdauer auf unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen (Fura 2) oder pH-Werte (BCECF) antworten.^{53, 54} Bei einer bekannten Lebensdauerabhängigkeit bietet sich dann die Möglichkeit, aus einem FLIM-Bild ein neues Bild zu rendern. Dieses kann dann örtlich auf-

gelöst den entsprechenden Parameter oder eine Verteilungsdichte der Moleküle aufzeigen, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff interagiert.

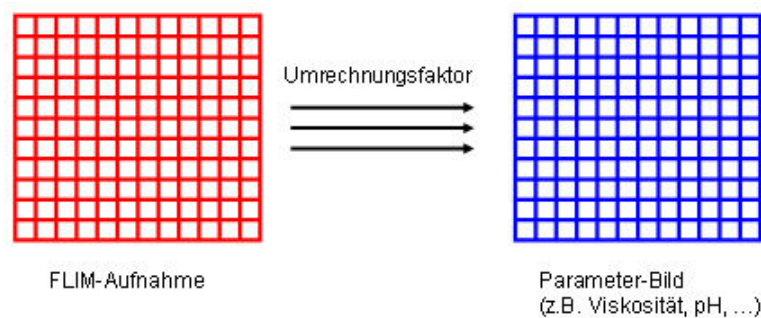


Abbildung 4.3 Erzeugen eines Parameter-Bildes aus einer Fluoreszenzlebensdauerabhängigkeit

Dieses Verfahren kann man als so genanntes Parameter-Mapping (oder Molecular Imaging) bezeichnen. In Kapitel 5 werden weitere Parameter-Maps (pH- und Brechungsindexbilder) vorgestellt.

4.3 3-D Imaging

Eine der eindrucksvollsten Anwendungen bei jeglichen Imagingverfahren ist die dreidimensionale Rekonstruktion des zu beobachtenden Objektes. Diese 3D-Imaging-Techniken sind bereits mit *Computed Tomography* (CT) oder *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) in der Medizin bekannt und werden täglich angewendet. In der Fluoreszenzmikroskopie steht diese Technik aber erst noch am Anfang, eignet sich aber für einzelne Zellen oder kleinere Gewebestücke sehr gut. Voraussetzung hierfür sind einzelne zweidimensionale Bilder eines Objektes, die zu einem dreidimensionalen gerendert werden.

Die Leistungsfähigkeit der Apparatur in diesem Gebiet soll anhand der schwachen NAD(P)H-Autofluoreszenz demonstriert werden. Das NAD(P)H ist in allen Zellen, die Glykolyse oder Photosynthese betreiben, vorhanden. Zu dessen Funktion sei auf Kapitel 6 verwiesen, wo ausführlich über dieses interessante Molekülpaar gesprochen wird. Hier dient es zunächst als ein endogener Farbstoff mit schwacher Fluoreszenz mit dessen Hilfe eine Zelle visualisiert wird. Eine Methode, die berührungsfrei und ohne biochemischen Eingriff in Form von Anfärben erfolgt und deshalb als sehr wertvoll bezeichnet werden darf. Abbildung 4.4 zeigt, in Anbetracht der Tatsache, dass die Bildinformation aus reiner NAD(P)H-Autofluoreszenz stammt,

zunächst ein beachtlich scharfes, zweidimensionales Bild einer insulinproduzierenden MIN6 β -Zelle. Dieses Bild wurde bei 760 nm mit dem TrimScope (64 Strahlen) aufgenommen. Die Zelle befand sich in einem vertieften Objektträger in einer PBS-Lösung (phosphatgepufferte Kochsalzlösung).

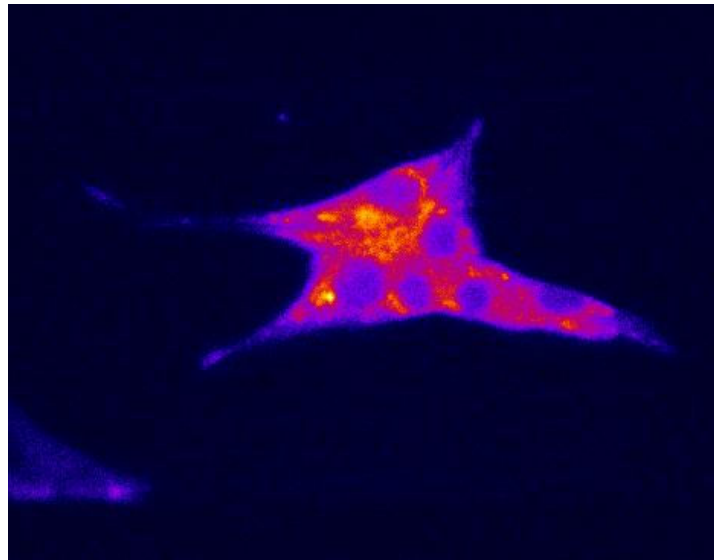


Abbildung 4.4 Intensitätsbild der NAD(P)H-Fluoreszenz einer MIN6 β -Zelle

Nun werden 22 solcher Bilder in 1 μ m Abständen aufgenommen. Dabei hilft ein motorisierter Mikroskoptisch, der nach jeder Aufnahme automatisch zur nächst tieferen Position fährt. Die Aufnahmen sind im Anhang in Abbildung A 2 zusammengefasst. Diese werden als Bilddateien in ein Programm geladen und ein 3D-Rendering durchgeführt (hier mit einer Demoversion der Software 3D-Doctor). Abbildung 4.5 zeigt das neu zusammengesetzte Bild. Das schwache Fluoreszenzsignal wird bis in die spitzen Ausläufer der Zelle hinein gut genug registriert, um hier ein dreidimensionales Rendering zu ermöglichen.

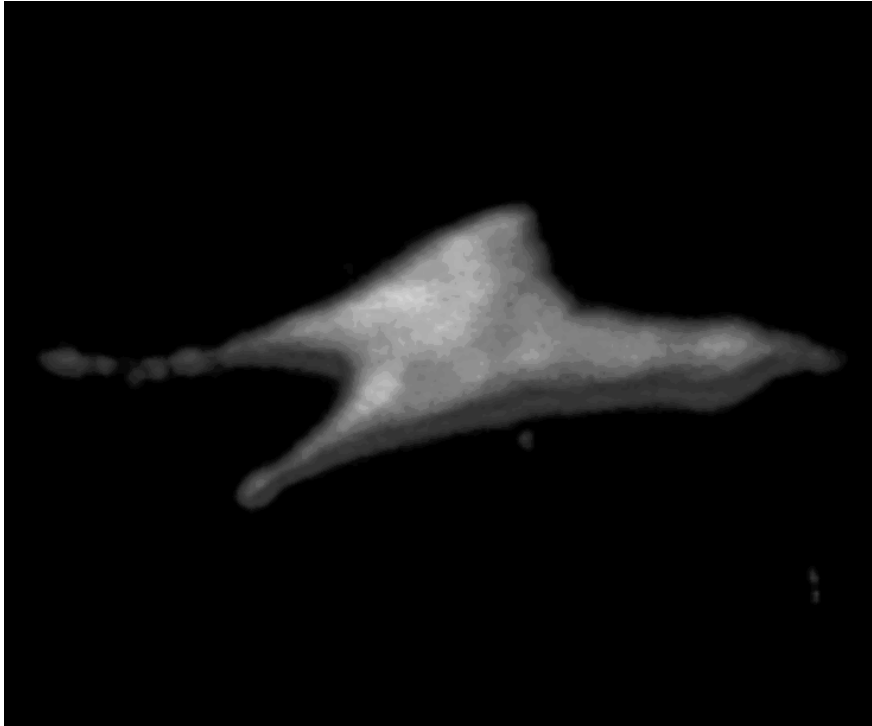


Abbildung 4.5 3D-Rendering aus 22 Einzelintensitätsbildern in 1 μm Abstand einer MIN6 β -Zelle

Diese Aufnahmen zeigen nach bisherigem Kenntnisstand das erste dreidimensional rekonstruierte Abbild einer lebenden Zelle, das aus reiner NAD(P)H-Autofluoreszenz generiert wurde. Die NAD(P)H-Autofluoreszenz war bei bisher bekannten Aufnahmetechniken so schwach, dass die biologischen Proben durch lange Belichtungszeiten über ihre Belastungsgrenzen hinweg bestrahlt werden mussten. Die vorgestellte NAD(P)H-Aufnahmetechnik erlaubt eine Fluoreszenzausbeute, die um mehr als eine Größenordnung über den bisherigen Methoden liegt.

Um aus diesen 3D-Messungen mehr Details zu gewinnen, wurden noch feinschrittigere Aufnahmen gemacht. Es folgte eine andere Messreihe mit insgesamt 60 Einzelintensitätsbildern, die nun in 500 nm Abständen aufgenommen wurden. Eine leistungsstärkere Software namens Volocity® wurde diesmal benutzt und erlaubte ein noch detaillierteres 3D-rendering. Dieses ist in Abbildung 4.6 (Querformat) dargestellt. Die Zelle fängt oben mit einer ebenen Fläche an. Mit dieser Fläche ist sie auf dem Deckglas angewachsen, und erstreckt sich gut 20 μm in die Höhe. Auf der linken Seite erkennt man die Zellkerne, die als dunkle Bereiche vorliegen, da hier die NAD(P)H-Fluoreszenz am niedrigsten ist. Rechts oben wurde mit der Software in die rekonstruierte Zelle hineingefahren und die Helligkeit reduziert, so dass nur noch die hellsten Bereiche sichtbar geblieben sind. Diese Bereiche stellen die Mitochondrien der Zelle dar, wo die NAD(P)H-Fluoreszenz die intensivste ist. Das gerenderte 3D-Bild lässt sich in

beliebige Richtungen drehen und man kann es in neue Ebenen zerlegen, um die optimale Perspektive zu finden. Die Aufnahmen selbst, aus denen das Bild rekonstruiert wurde, konnten innerhalb von 51 Sekunden gemacht werden. Ein Intensitätsbild wurde innerhalb von 850 ms aufgenommen. Es darf festgehalten werden, dass nie zuvor dreidimensionale Einsichten in eine biologische Zelle mit reiner Autofluoreszenz in solch einem schnellen Aufnahmeverfahren und in dieser Güte erzeugt wurden. Die geringe Photobelastung der Probe steigert zusätzlich die Attraktivität dieses Verfahrens.

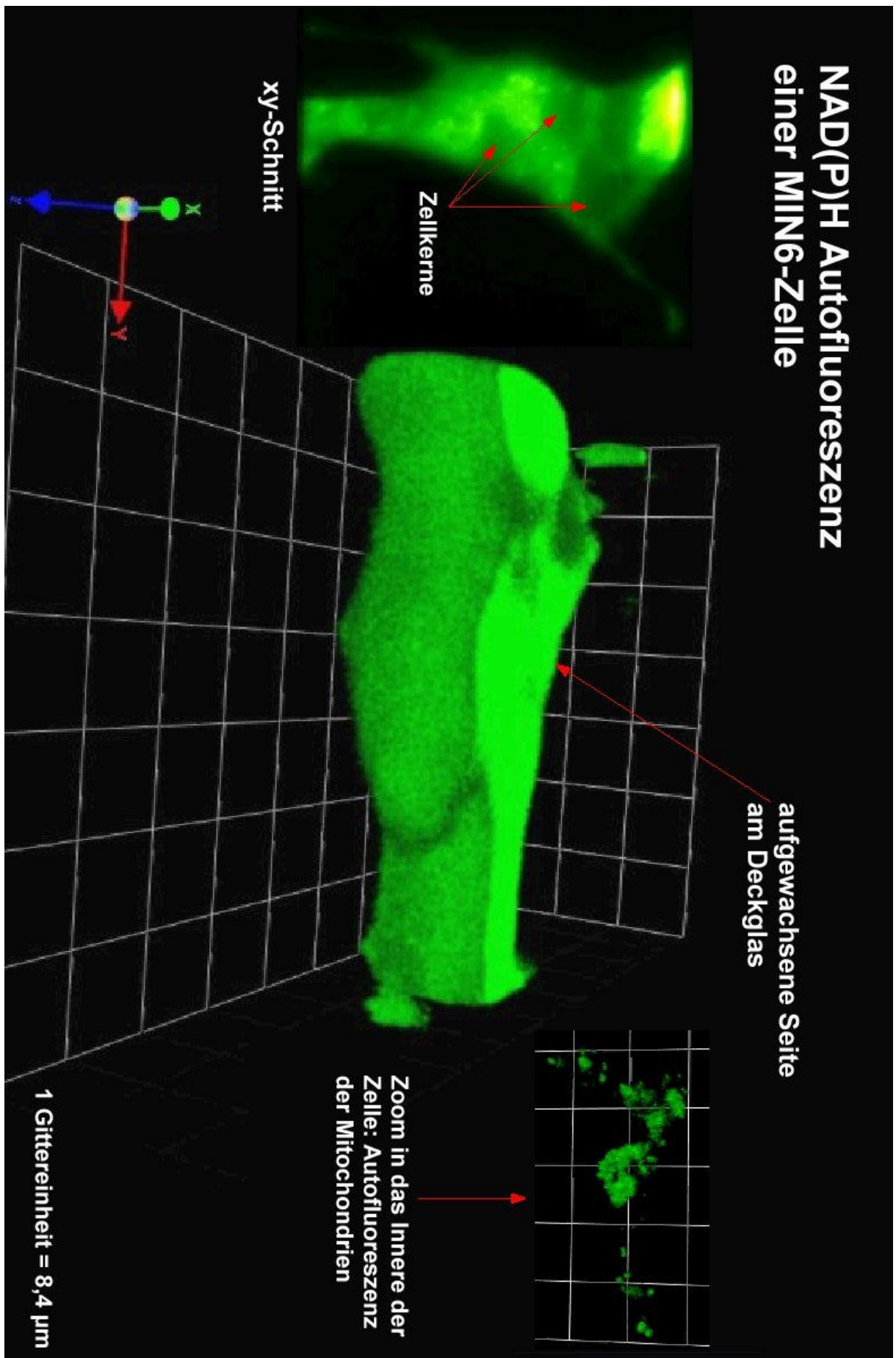


Abbildung 4.6 3D-Rendering einer MIN6 β -Zelle mit 60 Einzelintensitätsbildern

Es fällt auf, dass die Auflösung bei den FLIM-Aufnahmen schlechter ist, als bei den Intensitätsbildern (vgl. z.B. Abbildung 4.2 und Abbildung 4.4). Dies ist auf die Picostar zurückzuführen. Wenn wir uns an den Aufbau des Mikroskops erinnern, so wird zunächst die Fluoreszenz mit der Picostar registriert (Abbildung 3.5). Hier werden an einer Photokathode Elektronen ausgeschlagen und auf die MCP beschleunigt. Innerhalb der MCP findet dann die Verstärkung statt. Das Problem lässt sich hier auf die Kanalgröße des MCP reduzieren. Sie beträgt zwar $10\text{ }\mu\text{m}$ ist aber effektiv als $20\text{ }\mu\text{m}$ anzusehen. Der Grund dafür liegt im so genannten „cross-talk“ der einzelnen Kanäle. Bei der Verstärkung in einem bestimmten Kanal kommt es teilweise zur Auslösung von Elektronen im benachbarten Kanal, so dass sich die örtliche Information verschlechtert. Die CCD-Pixelgröße liegt wiederum bei ca. $6,45\text{ }\mu\text{m}$. Zwischen CCD und MCP gibt es eine Anpassung durch eine Linsenoptik, also eine etwa 2,17fache Verkleinerung. Reine Intensitätsbilder wie in Abbildung 4.4 können ohne die Picostar aufgenommen werden und geben daher ein schärferes Bild. Für die zeitliche Auflösung für Lebensdauermessungen ist jedoch die PicoStar mit seiner variablen Verschlusszeit nötig. Dieses Problem muss an dieser Stelle als hinnehmbar angesehen und durch Objektive mit höherer Vergrößerung ausgeglichen werden. Eine Möglichkeit, mehr Informationen in eine FLIM-Aufnahme zu bringen, wäre es, die scharfen Intensitätsbilder mit den FLIM-Daten in jeweils verschiedenen Farbskalen neu zu rendern. Hierzu bräuchte man aber einen Aufbau, der zwei Kameras enthält. Die eine müsste das Fluoreszenzlicht direkt mit dem CCD-Chip registrieren, die andere das zeitlich aufgelöste und verstärkte Licht der PicoStar verarbeiten. Die verschiedenen Imagingtechniken zeigen aber, dass das aufgebaute System ein leistungsfähiges Werkzeug für die Biowissenschaften sein kann. Gerade die FLIM-Methode ermöglicht es einem Trend zu folgen, der in diesem Gebiet immer wichtiger wird: Das Molecular Imaging. Hier wird, weg von morphologischen Betrachtungsweisen, das Visualisieren von Molekülen in den Fokus gerückt. Die spezifischen Farbstoffe können hier besondere, bisher verborgene Phänomene visualisieren. Das Ausnutzen endogener Farbstoffe, also der intrinsischen Fluoreszenz, von Biomolekülen erlaubt wiederum eine Einsicht in Zellen oder Gewebe, wie sie schonender nicht sein kann. Eine FLIM-Auswertung von Biomolekülen ist in Kapitel 6 durchgeführt worden, und kann sogar Stoffwechselprozesse visualisieren.

5 Dermale pH-Messungen

Der pH-Wert der Haut und in Zellen allgemein ist Gegenstand vielzähliger Forschungsprojekte. Die menschliche Haut ist mit 1,5-2 m² das oberflächengrößte Organ und hat Aufgaben wie Schutz (physikalischer, chemischer und immunologischer Art), Wärmeregulation und die Aufnahme von Sinnesreizen.²¹ Ersteres ist unter anderem durch den „sauren“ Charakter der Haut gewährleistet. Abhängig von Körperstelle, Geschlecht und Art wurden Werte zwischen pH 4,5 und 6 gemessen.⁵⁵ In den ersten 10 bis 20 Zellschichten der menschlichen Hornhaut nimmt jedoch die H⁺-Konzentration 100- bis 1000fach ab, und bildet so eine Art pH-Gradienten in der Epidermis.⁵⁶ In ca. 10 µm Tiefe, in der man auf das Stratum granulosum trifft, ist der pH-Wert bereits neutral. Pharmakologische Experimente zeigen, dass die Barrierefunktion der Hornhaut von dem pH-Wert entscheidend beeinflusst werden kann. So ist ein Verständnis von der Charakteristik des pH-Werts in der Haut wichtig für Verbesserungen von kutanen Applikationen in der Pharmazie und Medizin. Umso wichtiger sind geeignete Methoden für eine subzelluläre pH-Wert Beobachtung, um dieses Verständnis aufzubauen. Durch die Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Technologie der TU-Braunschweig stehen uns speziell gezüchtete Hautkonstrukte zur Verfügung, deren pH-Wert-Charakter wir mit dem von „normaler“ Humanhaut vergleichen wollen.

Experimente mit solchen Hautkonstrukten stellen eine denkbare Alternative zu Versuchen an der Tierhaut dar, wenn es z.B. um Erprobungen von neuen Medikamenten (Salben) geht. Parallel hierzu werden die Hautkonstrukte immer komplexer, was ebenfalls der Transplantationsmedizin zugute kommt. Bestand etwa künstliche Haut anfänglich aus einfachen Häufungen von Zellen einer Sorte, so lassen sich derzeit Modelle anfertigen, die die verschiedenen natürlichen Hautschichten nachahmen und daneben von kapillarähnlichen Strukturen – also Vorgängern von Blutgefäßen – durchzogen werden.⁵⁷

Im Folgenden soll ein besonderer Fluoreszenzfarbstoff erlauben, hier eine Aussage über das umgebende Medium und dessen pH-Wert zu machen. Besonderes Augenmerk wird hierbei auch auf den Brechungsindex der Haut gelegt, da der pH-Farbstoff von diesem beeinflusst wird. Bisher sind nur gemittelte Brechzahlen für biologische Gewebe bekannt. Die folgenden Experimente werden hier neue Einsichten bezüglich Zellen und Interzellularraum aufzeigen.

5.1 BCECF als pH-Sensor

Das Molekül BCECF (Abbildung 5.1) ist ein Fluoresceinderivat und zeigt eine empfindliche Fluoreszenzlebensdaueränderung bei variierenden pH-Werten.⁵⁸

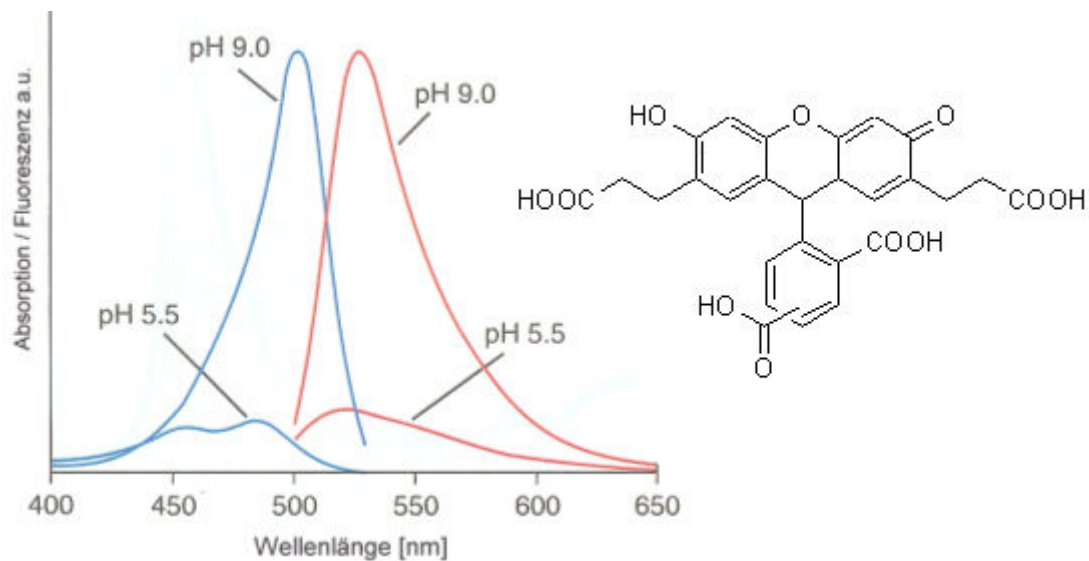


Abbildung 5.1 UV-VIS / Fluoreszenz Spektrum⁵⁹ und Strukturformel des BCECF (Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein). Seit seiner Vorstellung⁵⁸ in 1982, ist es ein weit verbreiteter pH-Indikator für intrazelluläre, biologische Anwendungen.

Das UV-VIS / Fluoreszenz Spektrum des BCECF zeigt ebenfalls ein stark pH-abhängiges Verhalten. Die Intensität der Absorption und Emission variiert stark zwischen den beiden gezeigten pH-Werten, jedoch bleibt die spektrale Lage mit 490 bzw. 530 nm relativ konstant. Die 4 bzw. 5 Carboxylgruppen des Moleküls bewirken eine Rekonfiguration des π -Elektronensystems, letzteres ändert sich und damit seine spektralen Eigenheiten (z.B. Amplitude), je nach Protonierungszustand.

Das in Kapitel 4.2 vorgestellte Parameter Mapping soll hier genutzt werden, um diese Fluoreszenzlebensdauerunterschiede aus einer FLIM-Aufnahme in ein pH-Bild umzuwandeln. Um dieses durchzuführen, wird zunächst eine Kalibriergerade (Lebensdauer \leftrightarrow pH-Wert) gemessen.

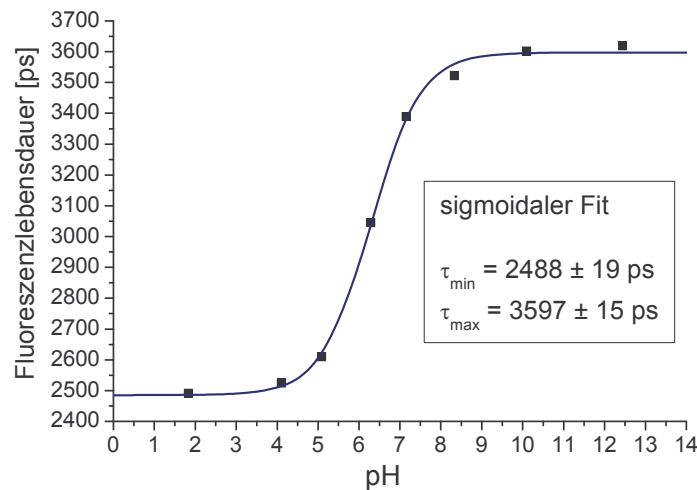


Abbildung 5.2 Fluoreszenzlebensdauer des BCECF bei unterschiedlichen pH-Werten in wässriger Lösung

Die Lebensdauerzeiten wurden in wässrigen Pufferlösungen mit ausgewählten pH-Werten aufgenommen. Die Laserwellenlänge lag bei 840 nm. Diese acht pH-Werte veranschaulichen die starke Fluoreszenzlebensdaueränderung des BCECF in dem Bereich zwischen pH 5 und 9 und somit die vorzügliche Eignung, um sehr sensitiv in diesem Bereich den pH-Wert zu definieren (der Äquivalenzpunkt liegt bei $pK_a = 6,98$). Die Fluoreszenzlebensdauer variiert zwischen diesen pH-Werten zwischen 2,5 und 3,6 ns. In Anbetracht der Möglichkeit, die Lebensdauer auf einige 10 ps genau zu bestimmen, wäre eine pH-Bestimmung theoretisch auf ein Hundertstel genau durchführbar.

Um dieses polare Molekül in die Zellen zu „schleusen“ muss die veresterte, membranpermeable Form BCECF/AM (der AcetoxyMethylester) verwendet werden. In der Zelle wird das BCECF durch die Esterase, einem zelleigenen Enzym, durch hydrolytische Spaltung dann freigesetzt. Ist das Molekül erst einmal in der Zelle, sorgen dann diese Carboxylgruppen durch ihren polaren Charakter für eine hohe Zurückhaltung in der Zelle, da sie einen Durchgang durch die Zellmembran stören.

5.2 Die Brechungsindexkorrektur

Bevor die FLIM-Aufnahmen des BCECF, wie in Abbildung 4.3 verdeutlicht, in pH-Bilder umgerechnet werden, muss die in der Theorie erwähnte Brechungsindexabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer berücksichtigt werden. Den Effekt auf die Fluoreszenzlebensdauerabhängigkeit haben GRATTON et al.⁶⁰ in ihren Experimenten an der Epidermis durch

$$k_F = 2,88 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \int \frac{(2\nu_0 - \nu)}{\nu} \cdot \epsilon_\nu d\nu = \frac{1}{\tau_F} \quad (5.1)$$

beschrieben. Die Geschwindigkeitskonstante k_F (vgl. Gleichung (2.16)) ist hier in Zusammenhang mit dem Brechungsindex n , der molaren Extinktion ϵ_ν bei der Frequenz ν und der Frequenz ν_0 des Übergangs vom S_0 in den S_1 -Zustand gebracht. Mit Formel (2.17) kann dies auf die Form

$$\tau_F = \frac{\Phi_F}{2,88 \cdot 10^{-9} \cdot \int \frac{(2\nu_0 - \nu)}{\nu} \cdot \epsilon_\nu d\nu} \cdot \frac{1}{n^2} \quad (5.2)$$

gebracht werden. Wir vereinfachen diese Gleichung unter der Prämisse, dass die Versuchsbedingungen gleich bleiben, indem wir den linken Faktor zu einer Konstanten zusammenfassen

$$\tau_F = C \cdot n^{-2} \quad (5.3)$$

Gerade in biologischem Gewebe herrschen (physikalisch) ungleiche Bedingungen; verschiedene Zelltypen und Zellschichten bedingen mitunter ungleiche Brechungsindizes. Jedoch haben GRATTON et al. in ihren Versuchen einen durchschnittlichen Brechungsindexwert für die Haut in einer bestimmten epidermalen Tiefe für ihre Berechnungen vorausgesetzt und benutzt. Der Brechungsindex kann aber nach Gleichung (5.3) durch Messung einer Fluoreszenzlebensdauer ermittelt werden, vorausgesetzt, dass das entsprechende Fluorophor auch nur von diesem abhängig ist.

Um die pH-Wert Korrektur mit dem Brechungsindex präziser durchzuführen, wurden an dieser Stelle Messreihen mit dem Molekül Coumarin 314 durchgeführt.

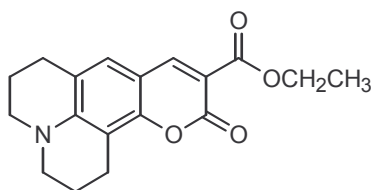


Abbildung 5.3 Molekülstruktur des Coumarin 314 (IUPAC-Name 1,2,4,5,3H,6H,10H-Tetrahydro-9-carbomethoxy-[1]benzopyrano(9,9a,1-g)-quinolin-10-on)

Dieses Molekül zeigt nur kleinste Abweichungen in der Fluoreszenzlebensdauer bei Viskositäts- und pH-Wertänderungen

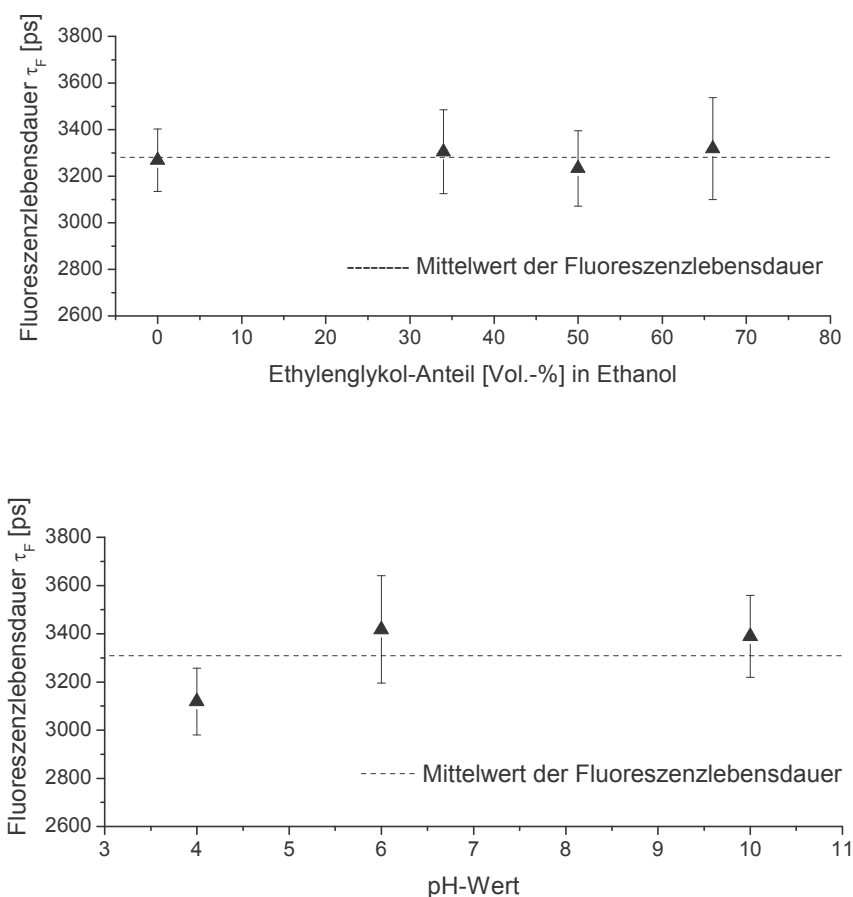


Abbildung 5.4 : Gemessene Fluoreszenzlebensdauern von Coumarin 314 bei verschiedenen Viskositäten (oben) und pH-Werten (unten). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar.

Für die Messungen in Abbildung 5.4 wurden unterschiedliche Viskositäten per Ethanol/Ethylenglykol-Mischungen und 3 verschiedene pH-Werte mit Pufferlösung erzeugt und bei 800 nm vermessen. Die Farbstoffkonzentration lag bei 100 μM . Auf die exakte Bestimmung der Viskositäten der Mischungen wurde hier verzichtet und stattdessen der Ethylenglykolanteil an der Ethanolösung genannt, da hier lediglich das Prinzip der Viskositätsunabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer gezeigt werden sollte (vgl. dynamische Viskositäten⁶¹ 1,20 mPa·s für Ethanol und 19,9 mPa·s für Ethylenglykol jeweils bei 20°C). Die Messungen zeigen eine Viskositäts- und pH-Wertunabhängigkeit im Rahmen der Messgenauigkeiten. In Abbildung 5.3 erkennt man, dass das Molekül bis auf den Carbethoxy-Rest keine intramole-

kulare Rotation durchführen kann. Vergleicht man dies mit einem Fluorophor wie DASPI, welches zwei drehbare aromatische Ringe (mit Rest) besitzt, kann zum Teil die Viskositätsunabhängigkeit erklärt werden, da dass Coumarin 314 Anregungsenergie nur schwach durch diesen Kanal der intramolekularen Rotation verlieren kann. DASPI zeigt im Einklang hierzu eine starke Viskositätsabhängigkeit seiner Fluoreszenzlebensdauer. Die relative pH-Unempfindlichkeit des Coumarin 314 im Vergleich zum BCECF wird schon beim ersten Anblick dieses Moleküls und seiner vier Carboxyl-Gruppen deutlich.

Es konnte mit diesen Messungen gezeigt werden, dass das Coumarin 314 für Brechungsindexmessungen genutzt werden kann, da es gegenüber anderen Störfaktoren wie pH-Wert und Viskosität unempfindlich ist. So können den zu untersuchenden biologischen Gewebearten detaillierte Brechungsindizes zugeordnet werden, um die spätere pH-Wert Korrektur des BCECF-FLIM differenzierter zu berechnen.

5.3 Anwendung in 3D-Hautkonstrukten

Die vorgestellte pH-Messmethode mit einer vorhergehenden Brechungsindexbestimmung, wurde in künstlichen Hautkonstrukten (siehe Kap. 3.4.3) durchgeführt. Nach dem Anfärben mit Coumarin 314 konnten zunächst FLIM-Aufnahmen dieses Fluorophors gemacht werden, die dann wiederum über die Beziehung

$$n_{Probe} = \sqrt{\frac{n_{H_2O}^2 \cdot \tau_{H_2O}}{\tau_{Probe}}} \quad (5.4)$$

welche aus Gleichung (5.3) hervorgeht, in ein Brechungsindexbild umgerechnet werden konnten. Hier wird jedem Pixel der Lebensdauermatrix der Probe (τ_{Probe}) ein eigener Brechungsindexwert zugeordnet. Dabei wurde die Fluoreszenzlebensdauer des Coumarin 314 in Wasser (τ_{H_2O}) aus mehreren Messungen zu einem Mittelwert von 3454 ± 17 ps bestimmt; der Brechungsindex des Wassers liegt bei $n_{H_2O}=1,333$.⁶¹ Diese Werte werden als Konstante für die Gleichung (5.4) genutzt. In Abbildung 5.5 wird solch ein Brechungsindexbild (n -map) dargestellt. Die Aufnahme zeigt deutlich, dass die spätere Korrektur für den pH-Wert je nach Region (Zellinneres oder extrazelluläre Matrix) deutlich unterschiedlich ausfallen wird. Man erkennt im rechten Bild, dass der Brechungsindex innerhalb der Zellen (grüne Bereiche) mit ca. 1,35 deutlich niedriger ist, als in dem Zellzwischenraum (rote Bereiche), wo er bei ca. 1,5 liegt. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte in den (stabilisierenden) Gly-

koproteinen und den langkettigen Polysacchariden der extrazellulären Matrix liegen. Diesem Interzellularraum schrieb man lange Zeit keine allzu große Rolle zu und betrachtete ihn lediglich als eine Art „Leim“ (Kollagen), der die Zellen zusammenhielt und als gewebeinternen Wasserspeicher. Diese Ansicht hat sich jedoch in den letzten Jahren stark gewandelt, da man viele wechselseitige Beeinflussungen zwischen Zelle und Interzellularraum erforschen konnte.^{62, 63}

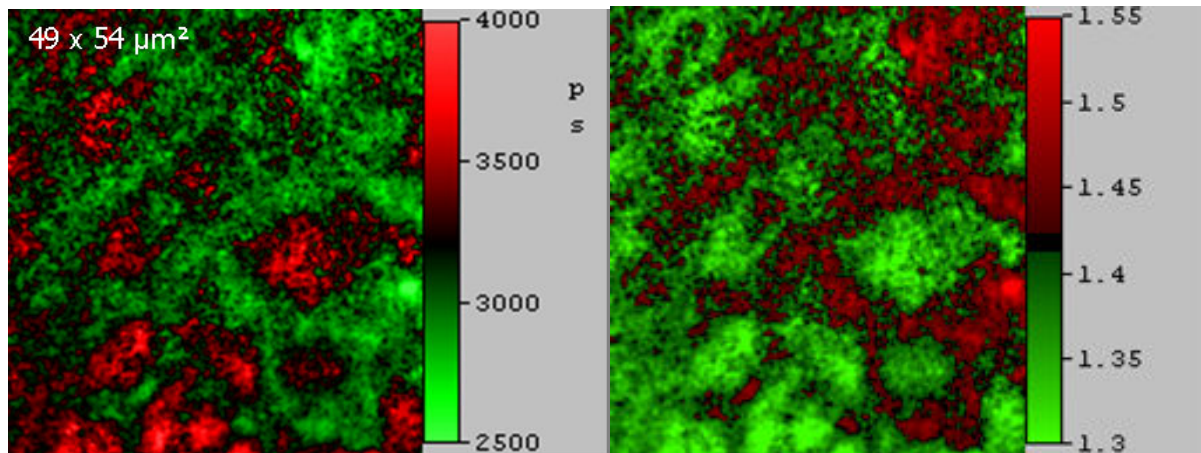


Abbildung 5.5 FLIM-Aufnahme (links) in einer epidermalen Tiefe von 3,4 μm mit Coumarin 314. Das rechte Bild zeigt das entsprechende n -map mit dem Brechungsindex, hier sind deutliche Unterschiede im Brechungsindex innerhalb der Zelle (grün) und dem Interzellularraum (rot) zu erkennen.

Bei Aufnahmen in unterschiedlichen Tiefen des Hautkonstruktes konnte ferner gezeigt werden, dass der mittlere Brechungsindex (bezogen auf das gesamte Bild) zunächst bei 1,48 liegt und zunächst schnell abnimmt. Ab einer epidermalen Tiefe von 15 μm stellt sich ein relativ konstanter Wert von 1,35 ein (Abbildung 5.6). Das entspricht bei den Hautkonstrukten auch in etwa dem Übergang in die Körnerschicht (Stratum granulosum). So ist die inter- und intrazelluläre Korrektur des pH-Wertes insbesondere in den obersten Hautschichten (der Hornhaut) von größerer Bedeutung.

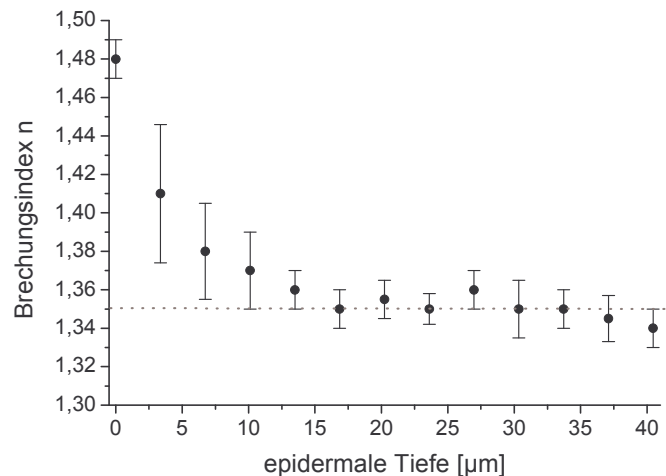


Abbildung 5.6 Änderung des gemittelten Brechungsindex mit zunehmender epidermaler Tiefe in einem 3D-Hautkonstrukt berechnet über die Coumarin 314 Lebensdauer

Mit den jetzt erhaltenen Brechungsindizes kann eine FLIM-Aufnahme mit dem Fluorophor BCECF in den Hautkonstrukten auf die richtige Lebensdauer korrigiert werden. Da sich schon in Abbildung 5.5 der große Unterschied zwischen Zellinnerem und der umgebenden Matrix zeigt, äußert sich dieser auch in dem pH-Bild (Abbildung 5.7). Man kann an diesem deutlich erkennen, dass der saure Charakter der Haut hauptsächlich durch die extrazelluläre Matrix getragen wird, wo ein pH-Wert von 5,5 herrscht. Im Zellinneren (rote Bereiche) ist mit pH 7 in dieser epidermalen Tiefe ein durchweg neutrales Milieu anzutreffen.

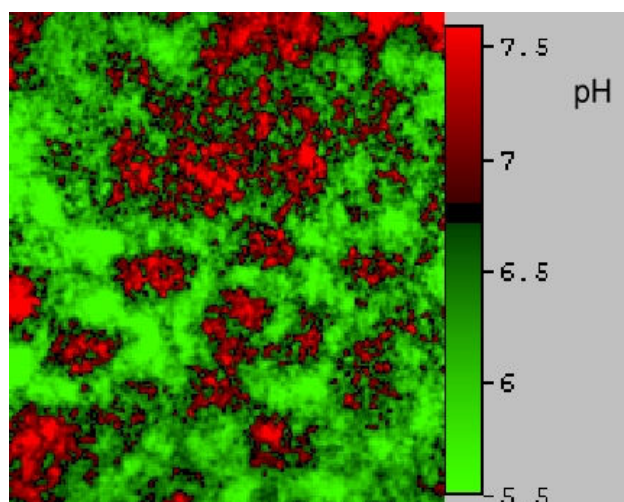


Abbildung 5.7 pH-Bild in einem Hautkonstrukt in einer Tiefe von 13μm (Zellen rot, Zellzwischenraum grün)

Eine Tiefenmessung (Abbildung 5.8) zeigt hier zusätzlich, dass die saure Hautflora insbesondere in den ersten Mikrometern der Hautkonstrukte vorherrscht. Ab einer Tiefe von etwa

18 μm ist kein starker pH-Anstieg innerhalb der Zelle zu erkennen, jedoch sind immer noch die zellulären Unterschiede gut aufgelöst.

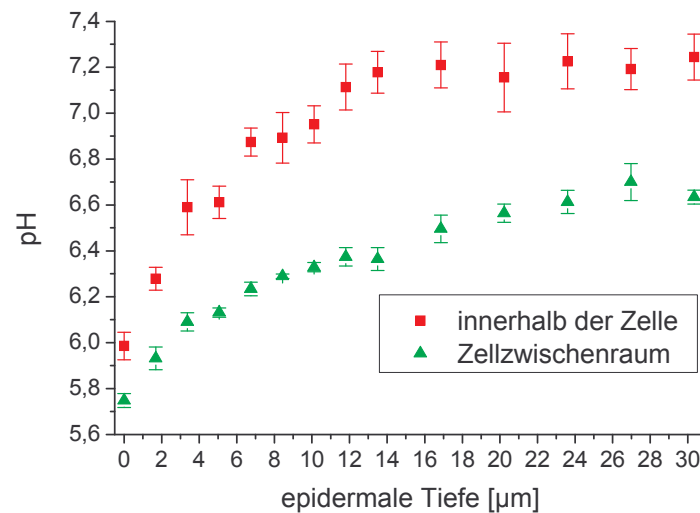


Abbildung 5.8 Unterschiedliche pH-Werte in bestimmten epidermalen Tiefen beim inter- und intrazellulären Vergleich

Fazit:

Es konnte gezeigt werden, dass die gezüchteten 3D-Hautkonstrukte ebenso wie die Humanhaut einen sauren Charakter in der Epidermis vorweisen und zusätzlich zu den gezeigten Permeationsstudien⁴⁹ sich in dieser Hinsicht als Hautäquivalente eignen.

Durch gesonderte Brechungsindexmessungen konnten deutliche Unterschiede zwischen dem inter- und intrazellulären Brechungsindex herausgearbeitet werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand, sind dies erste Brechungsindexbilder dieser Art von biologischem Gewebe. Hierdurch konnten differenziertere Einsichten des lokalen pH-Wertes in dem Gewebe gewonnen werden, wie sie bisher nicht möglich waren.

6 Energiestoffwechsel von Zellen

Ein Merkmal von lebenden Systemen (z.B. biologischen Zellen) ist der Energieaustausch mit ihrer Umgebung. Die laufende Zufuhr von Energie in die Zelle dient neben der Ausführung von mechanischer Arbeit und aktivem Molekül- bzw. Ionentransport, auch der Synthese von Biomolekülen. Für die Regulation des Energiestoffwechsels sind bestimmte „Energieträgermoleküle“ in allen lebenden Zellen vorhanden. Das Adenosintriphosphat (ATP) ist solch ein Energieträger. Durch Hydrolyse oder Aufbau seiner Phosphateinheiten, kann es viel Energie freisetzen bzw. speichern. Typische Werte für die freie Enthalpie (nach Gibbs)* unter zellulären Bedingungen liegen etwa bei -50 kJ pro mol .



An dem Prozess des ATP Auf- und Abbaus sind jedoch wichtige Reduktions- und Oxidationsäquivalente beteiligt, da die Energie, die aus der „Verbrennung“ (Oxidation) von Nahrungsstoffen wie Glucose nicht direkt verfügbar für den ATP-Prozess ist. Vielmehr werden bestimmte Elektronen-Carrier benötigt, die die Elektronen aus diesen Oxidationsprozessen der Nährstoffe für andere Schritte verfügbar machen. Das NAD^+ ist solch ein Oxidationsmittel, was maßgeblich bei der Erzeugung von ATP beteiligt ist, da es durch Reduktion maximal zwei Elektronen aufnehmen kann (dann geschrieben als $NADH + H^+$). Das Verhältnis $NADH/NAD$ ist dabei klein ($\ll 1$), da ein entsprechend positives Redoxpotential erzielt werden muss.

Das NADPH wiederum, was sich nur durch eine veresterte Phosphatgruppe zum NADH unterscheidet, ist vor allem an reduktive Biosynthesen gekoppelt.⁶⁴ Hier ist das Verhältnis $NADPH/NADP$ wiederum groß ($\gg 1$), um das entsprechend große Redoxpotential zu halten. Beide Coenzyme NADH und NADPH treten in allen Biosynthesen und Energiekreisläufen auf, da ein einzelnes Redoxpaar nicht gleichzeitig ein hohes Redoxpotential für biologische Oxidationen und ein niedriges Redoxpotential für biologische Reduktionen bieten kann. Diese beiden Redoxpaare NADH und NADPH, im Weiteren als NAD(P)H abgekürzt, haben in dem so genannten Katabolismus (z.B. Glucose Auf- und Abbau) und Anabolismus (z.B. Photosyn-

* die Gibbs-Energie zeigt in der Form $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ die Änderung der Reaktionsenergie ΔG eines Systems auf (ΔH = Änderung der Reaktionsenthalpie, T = Temperatur und ΔS = der Entropieänderung)

these) zentrale Rollen, und sind in einem gewissen Sinne dem Energiemetabolismus gleichzusetzen. Mehr als 500 bekannte Enzyme verwenden das NAD(P)H für die Katalyse von Reduktions-Oxidation-Schritten, darunter sind viele „gut bekannte“ und in der Natur „reichlich“ vorkommende Enzyme, die z.B. auch am Zitronensäurezyklus teilnehmen. Eine zeitliche und örtliche Beobachtung dieser Coenzyme (ihre Anhäufung in bestimmten Regionen oder Umwandlung), kann ein wertvolles Instrument für die Biowissenschaften sein. So können bestimmte Mechanismen in Zellen auch auf energiemetabolischer Ebene detaillierter analysiert werden.

6.1 Energiestoffwechselfmessungen über NAD(P)H-Fluoreszenz

Mitte des letzten Jahrhunderts war es bereits bekannt, dass biologische Zellen auf eine Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Autofluoreszenz reagieren. Ende der 1950er Jahre erkannte CHANCE in microfluorimetrischen Experimenten, dass die Autofluoreszenz hauptsächlich auf das NAD(P)H und Flavoproteine zurückgeführt werden kann.^{65, 66}

Betrachten wir die Coenzyme NAD(P)H unter chemisch-physikalischen Gesichtspunkten, so zeigen sich mit den Adenosin- und Nicotinsäureamid-Teilen der Moleküle Chromophore. Letztere bezeichnen den Teil eines Moleküls (Farbstoffs), in dem anregbare Elektronen vorhanden sind, die auch diese charakteristische Färbung (Absorption) verursachen.

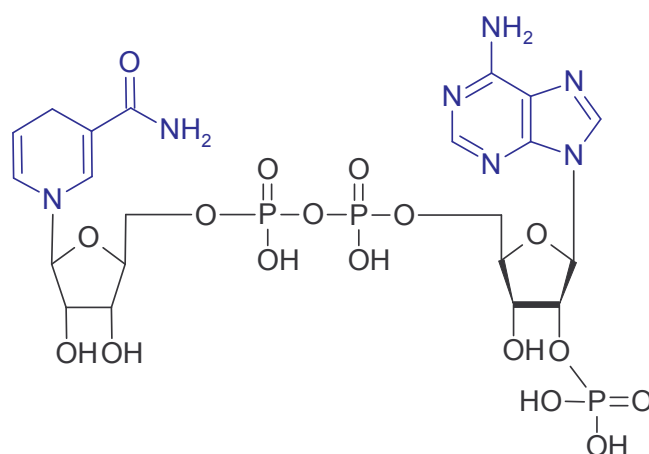


Abbildung 6.1 Strukturformel des NADPH (Nicotin- und Adenosinrest in blau), aufgrund des ausgehenden π -Elektronensystems ist eine Absorption in der Nähe des sichtbaren Bereiches zu erwarten

Bei den meisten organischen Farbstoffen ist es das π -Elektronensystem, was aus konjugierten Doppelbindungen aufgebaut ist. So sollte auch das π -Elektronensystem der genannten Adenosin- und Nicotinsäureamid-Teile eine Absorption im oder in der Nähe des sichtbaren Wellenlängenspektrums vorweisen.

Das UV-VIS-Spektrum bestätigt diese Absorption bei etwa 340 nm. Dabei zeigen das NADH und NADPH spektrophotometrisch das gleiche Verhalten⁶⁷, die Phosphatgruppe hat also diesbezüglich keinen großen Einfluss. Von Beachtung ist aber die oxidative Stufe der Coenzyme. Beide haben nur dann eine markante Absorption, wenn sie in der reduzierten Form vorliegen. So kann man also beide Coenzyme gleichzeitig anregen, und ihre Fluoreszenz gemeinsam detektieren.

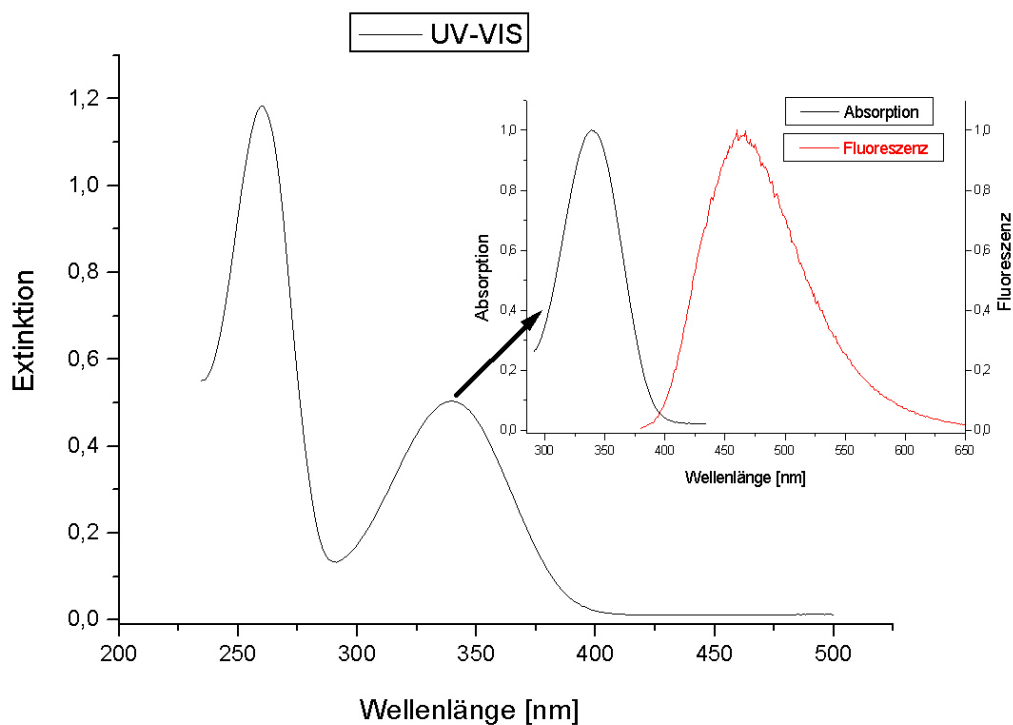


Abbildung 6.2 UV-VIS Spektrum des NADH in wässriger Lösung bei pH 7. Anregung bei 340 nm zeigt ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 465 nm (normiert). Das Coenzym NADPH verhält sich spektrophotometrisch gleich.

Mit frühen Lasertypen konnte man 1966 schon eine Zweiphotonenanregung des NADH in wässriger Lösung zeigen.⁶⁸ In späteren Experimenten hat man diese bei 750 nm (ZPA) auftretende Autofluoreszenz mit hochrepetierenden Lasersystemen in Zellen auf das NAD(P)H begrenzt,^{69, 70} im Grunde genommen wurden die Ergebnisse von CHANCE auf die ZPA übertragen und bestätigt. Eine zweite Fluoreszenzquelle bei dieser Wellenlänge ist das FAD (vgl. Abbildung 6.3), sie hat aber bei 900 nm (ZPA) ihr Anregungsmaximum und trägt bei 750 nm nur unwesentlich zur Gesamtfluoreszenzintensität bei.⁸⁰ Ein spektraler Filter 440 ± 40 nm

verschafft hier Gewissheit, dass nur die NAD(P)H-Fluoreszenz von dem Aufnahmesystem detektiert wird.⁷¹

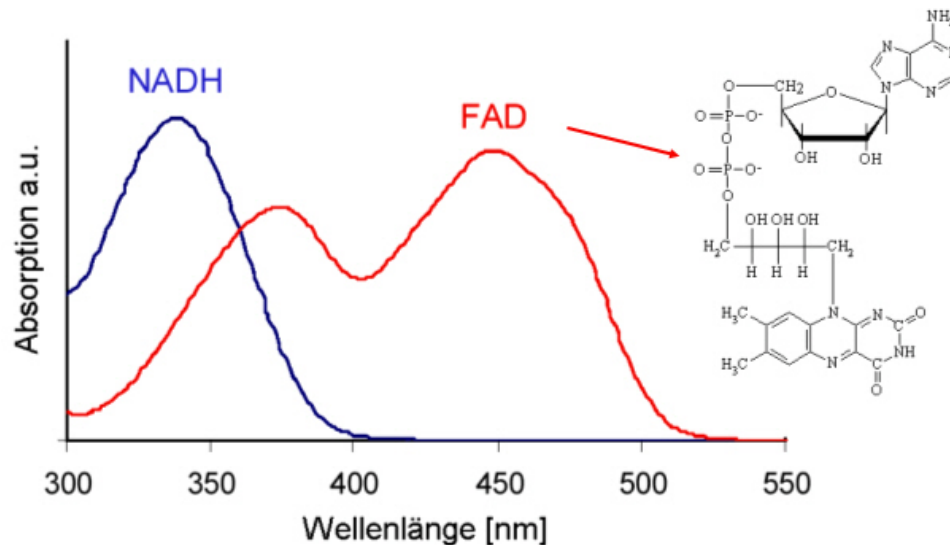


Abbildung 6.3 UV-VIS Spektren des FAD und NADH im Vergleich

Das Verhältnis von proteingekoppeltem zu freiem NAD(P)H spielt eine große Rolle für den Zellmetabolismus und ist Gegenstand vieler biochemischer Experimente.^{72, 73, 74} Je nach Energiestoffwechselaktivität kann sich dieses Verhältnis zwischen proteingekoppelt (enzymgebunden) und ungekoppelt (frei) verschieben. Trotz einiger Methoden, die die freie und proteingebundene Komponente detektieren, ist keine einfache, kalibrierfreie Methode für die Visualisierung dieser Verteilung entwickelt worden. Anfang der 1980er Jahre hat man schon versucht erste computergestützte Verfahren für die mathematische Unterscheidung zwischen freiem und gebundenem NAD(P)H aus dem Gesamtsignal zu entwickeln.⁷⁵ Jedoch waren diese keine Imagingverfahren, sondern microfluorimetrische, in denen man versucht hat, das Signal zwischen freier und gebundener Form durch die geringe spektrale Verschiebung der Fluoreszenz zu unterscheiden. Die gebundene Form zeigt hier eine leichte Blauverschiebung. Das geringe Signal-Rausch-Verhältnis hatte es bisher allgemein schwierig gemacht, das intrinsische NAD(P)H-Signal vernünftig zu detektieren. Die Phototoxizität bei EPA-Versuchen, in der das NAD(P)H mit 350 nm angeregt wurde, machte es zudem unmöglich, verlässliche Aussagen über geringe Veränderungen zu machen.⁷⁶ Aus diesen Gründen wurde die bisher detektierte NAD(P)H-Fluoreszenz und dessen biologische Aussagekraft in Imagingexperimenten mit Skepsis betrachtet.

Eine relativ neue Methode rückt die Lebensdauer dieser auftretenden NAD(P)H-Fluoreszenz in den Fokus. Diese Fluoreszenzlebensdauer kann in biologischen Zellen drastische Unter-

schiede aufweisen, je nachdem ob das NAD(P)H gekoppelt oder frei vorliegt. Diese Proteinkopplung bewirkt eine starke Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer, da der Nikotin- und Adenosinrest räumlich getrennt werden, und so der Relaxationspfad eingeschränkt wird. EVANS et al. berichteten hier von einer offenen und gefalteten Struktur des freien NAD(P)H und ermittelten Lebensdauern von 330 bis 590 ps.⁷⁷ Die Fluoreszenzlebensdauer des gebundenen NAD(P)H wurde in verschiedenen Experimenten zu ca. 2 ns bestimmt.^{15, 78} Diese Eigenschaft der Lebensdauerabhängigkeit der intrinsischen NAD(P)H-Fluoreszenz von dessen Kopplungszustand kann ausgenutzt werden, um Aussagen darüber machen zu können, ob und in welchen Zellregionen es zu verstärkten Proteinkopplungen kommt und wo sich freies NAD(P)H befindet.

Es wird nun eine FLIM-Aufnahmetechnik präsentiert, die es erlaubt zwischen freiem und gebundenem NAD(P)H zu diskriminieren. Dies geschieht mit einer sehr schnellen, bixponentiellen Auswertemethode, der in Kap. 2.4.1 vorgestellten nicht-iterativen PRONY-Methode. Hierzu genügen ca. 10 bis 20 Intensitätsbilder, die mit einem Python-Programm* (siehe Anhang A.2) eingelesen werden. Das Programm liefert drei neu berechnete Matrizen, die selbst als Bilder eingelesen werden können. Die ersten beiden Bilder stellen die Fluoreszenzlebensdauer der kurzlebigen und langlebigen Spezies dar (Abbildung 6.4).

* Python ist eine Programmiersprache, die mehrere Programmierparadigmen umfasst. Sie unterstützt die objekt-orientierte, aspektorientierte und funktionale Programmierung.

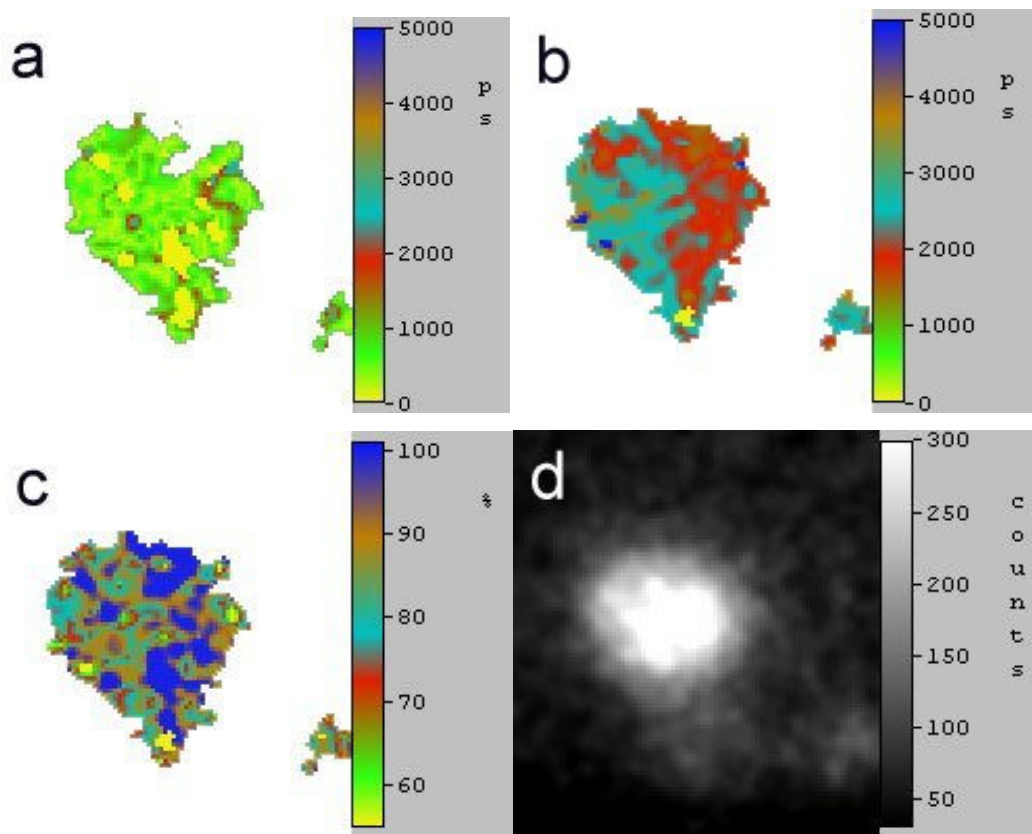


Abbildung 6.4 Gerenderte FLIM-Bilder (a und b) einer β -Zelle in einer Pankreas-Insel. Bild c zeigt den prozentualen Fluoreszenzsignalanteil des proteingekoppelten NAD(P)H zum Gesamtfluoreszenzsignal. Das Intensitätsbild wie es von der Kamera registriert wird, ist unter d dargestellt.

Das dritte Bild zeigt eine Verteilung. Sie zeigt das Verhältnis der Vorfaktoren aus Gleichung (2.25):

$$\frac{a_2}{a_1 + a_2} \quad (6.1)$$

Hier ist der Anteil der Fluoreszenzintensität des gekoppelten NAD(P)H (a_2) zum Gesamtsignalanteil ($a_1 + a_2$) gesetzt und stellt durch hohe Werte „aktive Regionen“ der Zelle dar. Abbildung 6.4 zeigt die berechneten FLIM-Bilder aus 14 Einzelintensitätsbildern einer β -Zelle aus einer Pankreas-Insel. Letztere wurde zuvor im Institut für Pharmakologie und Toxikologie einer Maus entnommen. Während der Messung wurde die Insel mit einer Krebs-Ringer-Lösung umspült. Hier stellt das Bild a das freie, nichtproteingekoppelte NAD(P)H dar. Es hat eine Lebensdauer von etwa 400 ps. Dies stimmt mit Literaturdaten über das freie NAD(P)H gut überein. Man erkennt weiterhin, dass das freie NAD(P)H flächendeckend über die ganze Zelle vorhanden ist. In Bild b ist das länger fluoreszierende, proteingekoppelte NAD(P)H dargestellt, das unterschiedliche Lebensdauerregionen zeigt. Dies liegt an unterschiedlichen Proteinkopplungen, die auch unterschiedliche Lebensdauern bedingen. Es zeigen

sich in der linken Bildhälfte deutlich höhere Lebensdauern. Bild c ist die prozentuale Angabe des Fluoreszenzsignalanteils des proteingekoppelten NAD(P)H an dem Gesamtfluoreszenzsignalanteil. Es gibt hier also wenige Regionen in der Zelle, in der das registrierte Fluoreszenzlicht aus nahezu 100% gekoppeltem NAD(P)H herrührt. Das Bild d zeigt ein einfaches Intensitätsbild. Aus solchen Aufnahmen in äquidistanten Zeitabständen werden die FLIM-Bilder berechnet. Über die erhaltenen Lebensdauerbilder a und b können Histogramme gelegt werden, um die Lebensdauerverteilung (frei/ gebunden) in der Zelle, wie in Abbildung 6.5 dargestellt, zu zeigen.

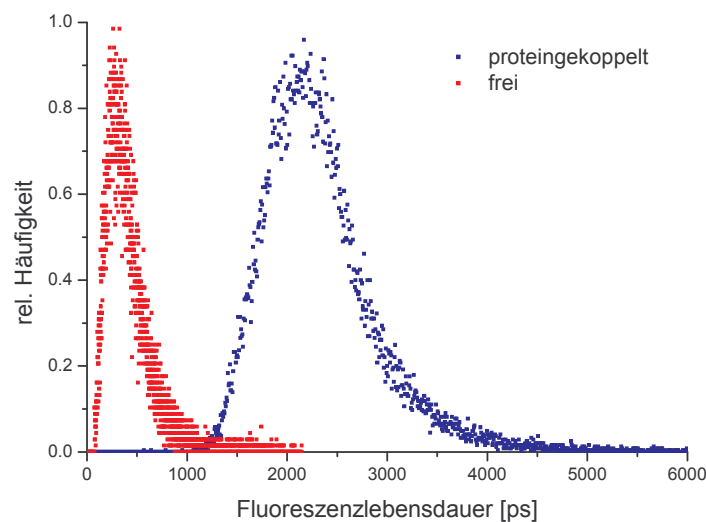


Abbildung 6.5 freies und proteingekoppeltes NAD(P)H zeigen starke Fluoreszenzlebensdauerunterschiede, in diesem Fall handelt es sich um ein Histogramm der NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauern aus dermalen Fibroblasten. Das rote Histogramm zeigt die Verteilung des freien NAD(P)H, das die kürzere Lebensdauer aufweist.

Diese Histogramme über die gesamten Bildpunkte zeigen mit ihren Maxima die mittlere Lebensdauer des freien (ca. 0,4 ns) und gekoppelten (ca. 2,1 ns) NAD(P)H an.

Es wurde an dieser Stelle eine Methode eingeführt, die es erlaubt, eine differenzierte Visualisierung des NAD(P)H-Zustandes (gekoppelt/ frei) in der Zelle zu zeigen. Die auf dem Imaginggebiet erstmals angewandte, nicht-iterative und biexponentielle PRONY-Methode erlaubt hierbei die Berechnung der einzelnen FLIM-Bilder in einem Bruchteil der bisherigen Auswertzeit. Trotz moderner Rechner macht sich die nicht –iterative Methode bei einigen hunderttausend Pixelauswertungen stark bemerkbar. Hiermit ist die Möglichkeit für ein Echtzeit-FLIM gegeben, welches das Lifetime-Imaging von schnellen biologischen Prozessen zugänglich macht.

6.2 Hochsensitives Intensitätsimaging mit hoher Zeitauflösung

Fluoreszenzmessungen an pankreatischen β -Zellen sind seit einigen Jahren Gegenstand verschiedener Experimente. An diesen konnte bereits in Diagrammen und PMT-Aufnahmen gezeigt werden, dass die Intensität der NAD(P)H-Autofluoreszenz allgemein bei Glucosestimulierung zunimmt.^{79, 80}

Das Imaging des sehr schwachen NAD(P)H-Fluoreszenzlichts aus biologischen Zellen ist eine Problemstellung, die die Leistungsfähigkeit der modernen Zweiphotonenmikroskopie offenbaren kann. Waren bisher nur Photomultiplier im Stande, sehr schwache Lichtsignale zu verarbeiten, so ist heutzutage die Aufnahmetechnik fortgeschritten genug, um viele Aufgaben in nahezu gleicher Güte, aber in einer um Größenordnungen schnelleren Zeit mit CCD-Kameras zu bewältigen. In Kapitel 6.1 wurden NAD(P)H-FLIM-Aufnahmen bereits gezeigt. Hier wurde ein einzelner Laserstrahl über die Probe gerastert, und es sind Belichtungszeiten von etwa 6 bis 10 Sekunden für eine Intensitätsaufnahme nötig. Die TrimScope-Technik erlaubt hier eine bis zu 14-mal höhere Fluoreszenzlichtausbeute als mit der Singlebeam-Variante.⁴⁴ Anhand der bereits vorgestellten insulinproduzierenden MIN6 β -Zellen (siehe Kap. 3.4.1) und der TrimScope-Technik werden an dieser Stelle biologische Ereignisse aufgezeigt. Es folgen örtlich (subzellulär) aufgelöste NAD(P)H-Fluoreszenzaufnahmen von MIN6 β -Zellen, die während der Messung mit Krebs-Ringer-Lösungen unterschiedlicher Glucosekonzentrationen umspült werden. Die hohe Fluoreszenzlichtausbeute dieses Verfahrens erlaubt zeitliche Auflösungen, die bisher nicht möglich waren und gleichzeitig eine sehr geringe Belastung der biologischen Probe. Die Zellen reagieren auf den Stimulus der Glucosekonzentrationserhöhung mit Insulinsekretion. Dies geschieht in Form von oszillatorischen Antworten, in denen das Insulin in „Wellen“ gebildet und ausgeschüttet wird. Hierzu werden die kultivierten MIN6 β -Zellen auf eine Umströmungskammer (siehe Kap. 3.4.2) gelegt und zunächst mit glucosefreier Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Die Lösung ist während der Messung in einem beheizten Wasserbad, um physiologische Temperaturen zu gewährleisten. Ist eine geeignete Zelle gefunden wird die Messung gestartet. Um den Effekt der Stimulierung zu sehen, wird während der Messung auf eine Krebs-Ringer Lösung mit einer veränderten (erhöhten) Glucosekonzentration gewechselt. Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7 zeigen zunächst beeindruckend, dass die schwache Eigenfluoreszenz der NAD(P)H-Moleküle mit dieser Methode gut aufgelöste Fluoreszenzbilder liefert. Diese Aufnahmen wurden innerhalb von 800

Millisekunden aufgenommen. Zellkonturen und Organellen können dargestellt und ihre Intensität im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

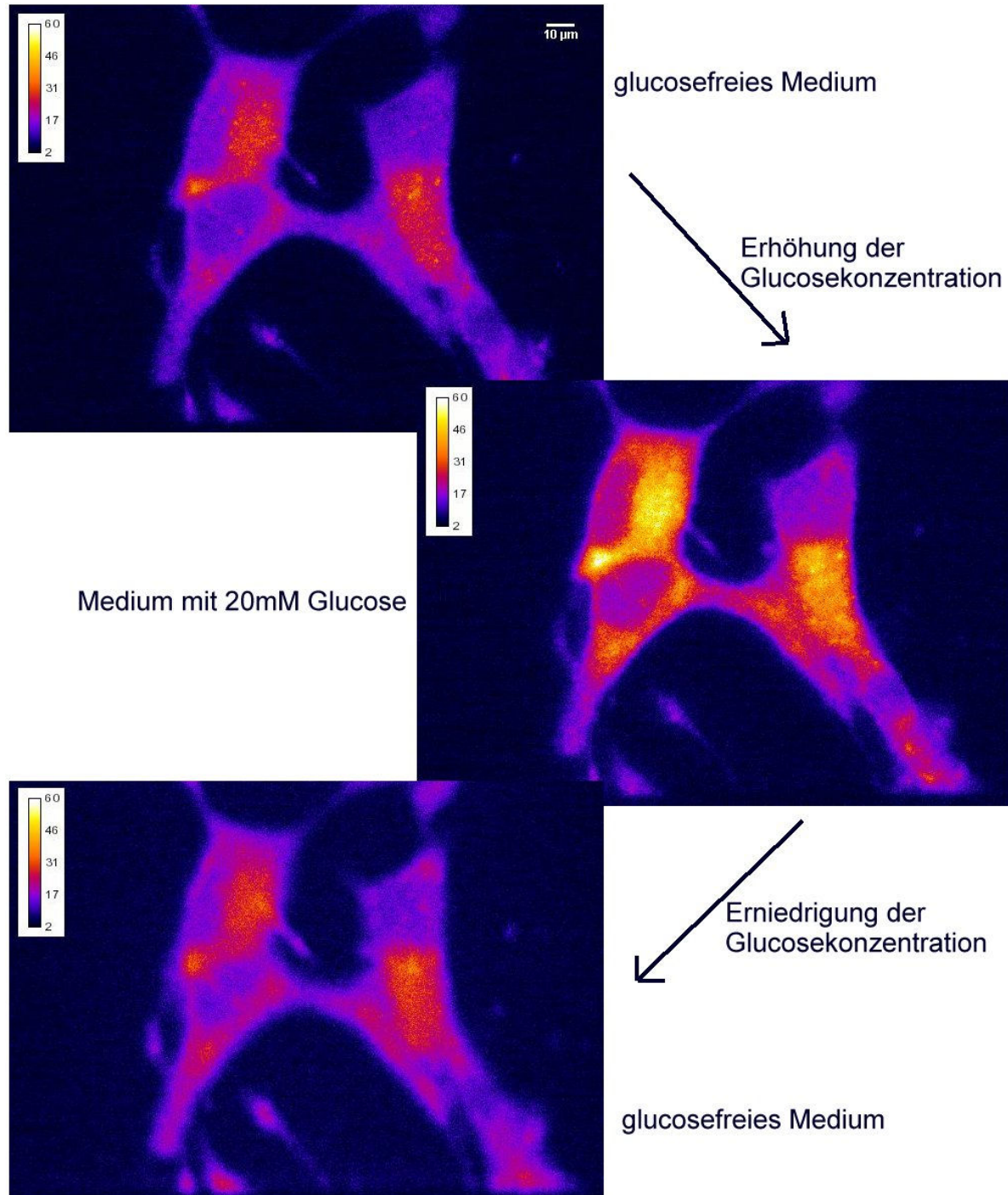


Abbildung 6.6 Fluoreszenzintensitätsmessungen an MIN6 β -Zellen bei Umströmung mit Krebs-Ringer-Lösung verschiedener Glucosekonzentrationen. Start bei 0 mM (oben), Wechsel auf 20 mM (Mitte) und wieder auf 0 mM Glucosekonzentration. Skalierung in willkürlichen Intensitätseinheiten

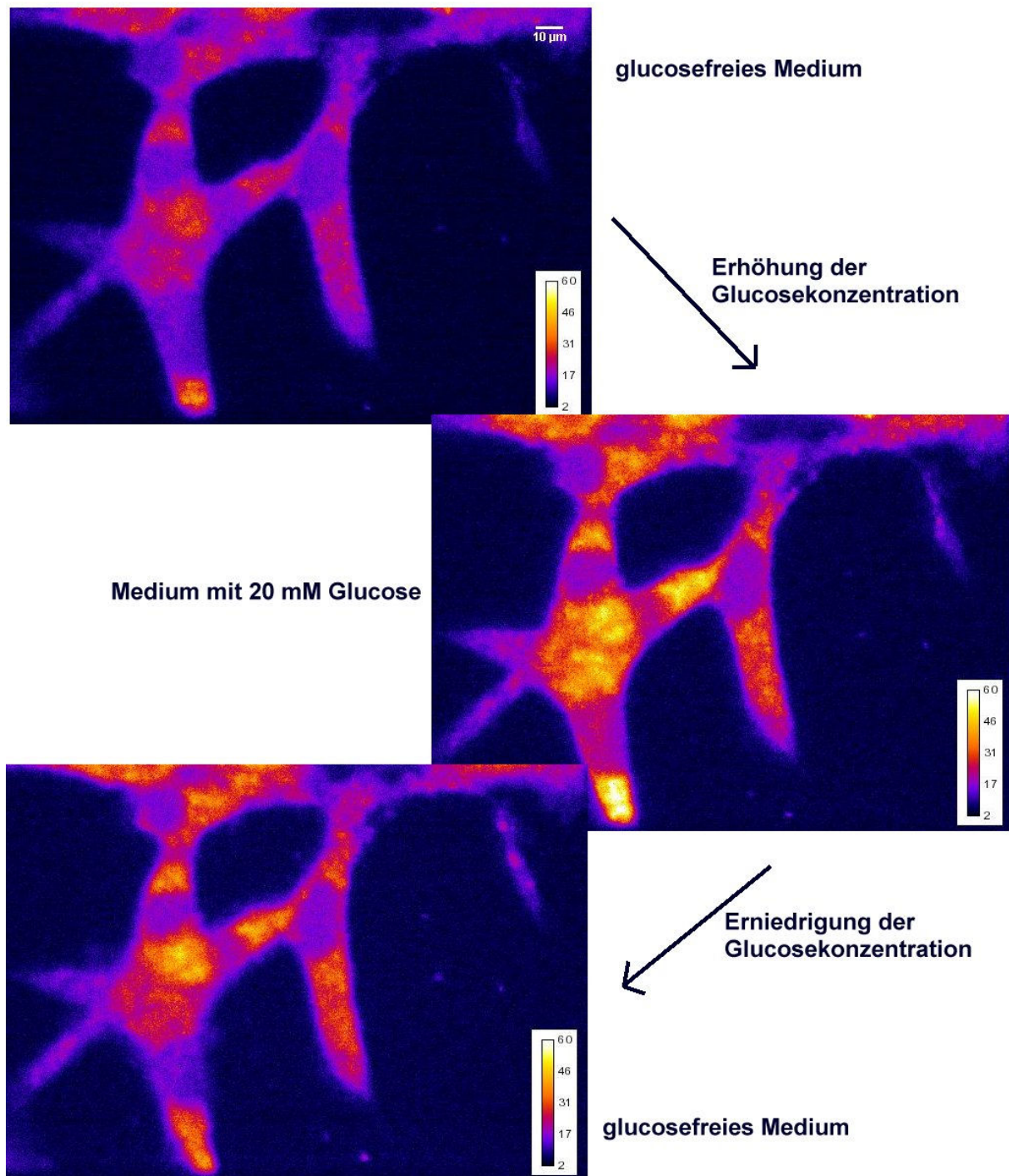


Abbildung 6.7 Fluoreszenzintensitätsmessungen an einer zweiten Min6 β -Zelle. Gleiches Vorgehen, wie in Abbildung 6.6

Die Anregungswellenlänge lag bei 770 nm bei einer Laserleistung von 1,45 W. Nach Aufspaltung in 64 gleiche Strahlen bleibt gut ein Drittel von dieser Leistung im Fokus über. Der PMT-Vergleich würde für solch eine Bild-Größe von ca. 600 x 430 Pixeln Aufnahmezeiten von einigen 10 Sekunden bis hin zu Minuten zeigen. Für schnelle biologische Antworten, die vi-

sualisiert werden sollen, wäre die PMT-Technik mit 40 bis 400 μs pro Pixel Aufnahmezeit zu langsam.

Weiterhin erkennt man wirkungsvoll den Anstieg des NAD(P)H-Signals bei Erhöhung der Glucosekonzentration. Die Bilder in der Mitte zeigen jeweils die erhöhte Glucosekonzentration, wo man deutlich erhöhte Intensitätsbereiche an verschiedenen Zellregionen erkennen kann. Zellkerne besitzen eine niedrige NAD(P)H-Konzentration und bleiben dunkel. Dieser veränderte metabolische Zustand ist auch ein Indiz für die Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses.⁸¹ Der erneute Wechsel auf eine glucosefreie Krebs-Ringer-Lösung resultiert in einer Abnahme der Intensität. Die β -Zellen benötigen eine gewisse Zeit, bis sie auf den Reiz der extrazellulären Glucosestimulation reagieren können. Diese liegt in der Regel bei wenigen Minuten, so dass die Abbildungen von oben nach unten jeweils einen Zeitraum von etwa einer viertel bis halben Stunde darstellen. Hierin mit einzurechnen ist noch die Zeit des Wechsels des umströmenden Mediums.

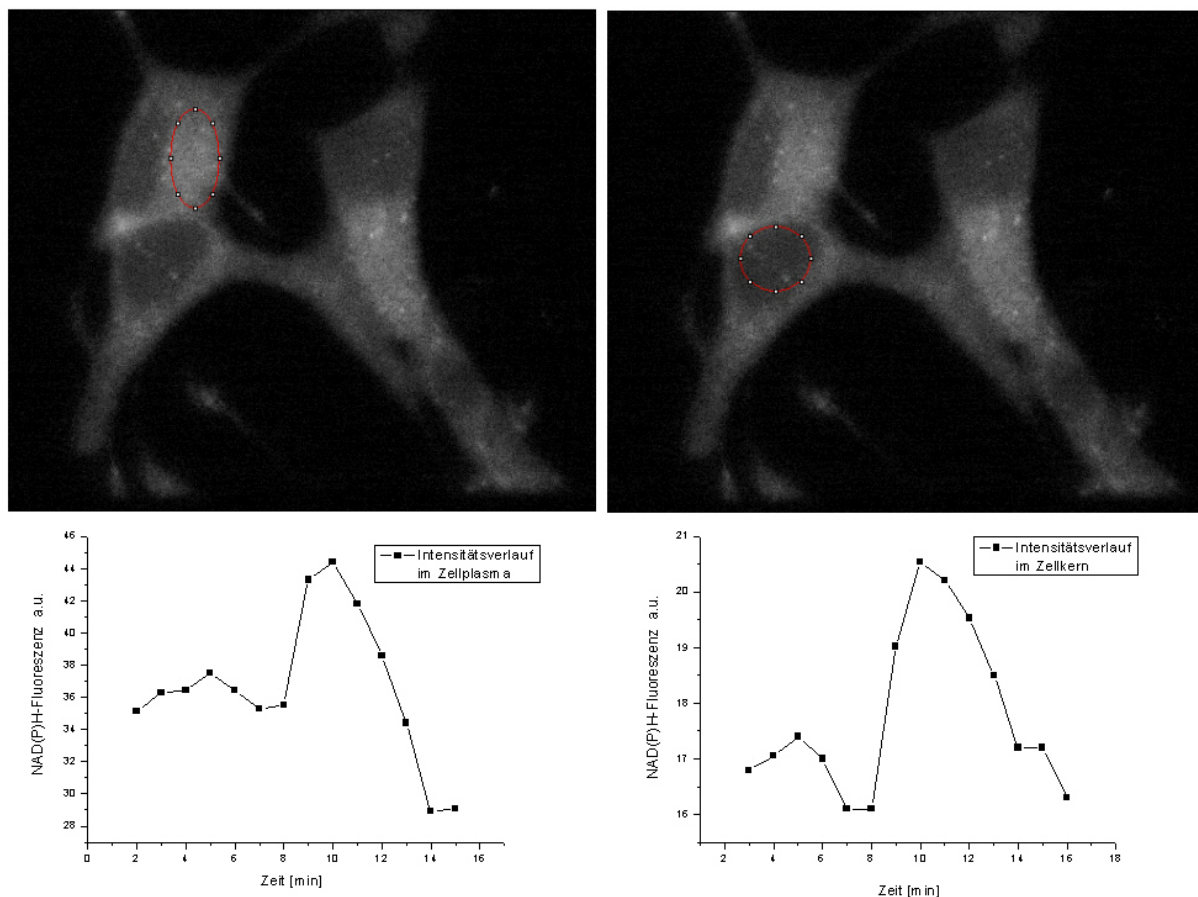


Abbildung 6.8 Zeitlicher Intensitätsverlauf der NAD(P)H-Autofluoreszenz mit Glucosestimulation im Zellplasma (links) und im Zellkern (rechts) im Vergleich

Eine getrennte zeitliche Beobachtung der Intensitätsverläufe im Zellkern und Zellplasma (Abbildung 6.8) zeigt zusätzlich, dass die Erhöhung der NAD(P)H-Fluoreszenz an beiden

Orten stattfindet. Zu Beginn der Messung wird von glucosefreiem auf ein Medium mit 20 mM Glucose gewechselt, der Anstieg findet erst nach ca. 5 bis 6 Minuten statt. Der erneute Wechsel auf ein glucosefreies Medium führt zur Intensitätsabnahme. Im dunkel bleibenden Zellkern ist die Intensität nur sehr niedrig aber auch hier gibt es einen Intensitätsanstieg um etwa 20% bei Glucosestimulierung, im Vergleich hierzu gibt es einen etwas stärkeren Anstieg (~25%) im stärker fluoreszierenden Zellplasma, wo auch die Mitochondrien als helle Punkte anzutreffen sind. Obwohl die Aufnahmetechnik NAD(P)H-Bilder im Sekundentakt liefern kann, wurde hier, um die Proben für eine möglichst lange Messung zu schonen und aufgrund der langsamen Reaktion auf die Glucosestimulation, ein Messabstand von je einer Minute gewählt. Jedoch ist das Messsystem auch für schneller ablaufende, biologische Prozesse wie z.B. intra- und interzelluläre Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration geeignet.

Die an dieser Stelle eingeführten Echtzeitmessungen an den MIN6 β -Zellen sollen im nächsten Kapitel erweitert werden. Eine Differenzierung und Charakterisierung des Anstiegs der NAD(P)H-Fluoreszenz soll dabei ein evtl. getrenntes Verhalten zwischen freiem und gebundenem NAD(P)H aufzeigen.

6.3 Energiestoffwechsel der insulinproduzierenden MIN6 β -Zellen

Erste ZPA-FLIM-Aufnahmen mit NAD(P)H Autofluoreszenz wurden noch mit Skepsis betrachtet und waren dadurch geprägt, dass richtige Maß an Laserleistung zu finden; bei zuviel drohte der Zelltod, bei zuwenig waren die Aufnahmezeiten als relativ lang anzusehen. Zudem wurden die Fluoreszenzsignale monoexponentiell ausgewertet, was keinen Aufschluss auf das getrennte Verhalten von freiem und gebundenem NAD(P)H gibt.⁸²

An dieser Stelle sollen nun erstmals biexponentielle NAD(P)H FLIM-Aufnahmen von MIN6 β -Zellen folgen, die während der Messung mit Krebs-Ringer-Lösungen unterschiedlicher Glucosekonzentrationen umspült werden. Die Zellen zeigen auf diesen Stimulus der Glucosekonzentrationserhöhung eine, wie bereits gezeigte, offensichtliche Reaktion (Kap.6.2). Dieser Prozess des Reagierens soll auf energiemetabolischer Ebene mit Hilfe der FLIM-Aufnahmen visualisiert werden, indem man auch zwischen freiem und gekoppeltem NAD(P)H unterscheidet.

Abbildung 6.9 zeigt so eine β -Zelle bei Umströmung mit glucosefreiem Medium. Auffällig auf den ersten Blick sind relativ hohe Fluoreszenzlebensdauern des proteingebundenen NAD(P)H in Bild a und dass ein sehr hoher Anteil an gebundenem NAD(P)H in der Zelle vorliegt (siehe Bild c). Die mittlere Lebensdauer beträgt hier ca. 2,8 ns.

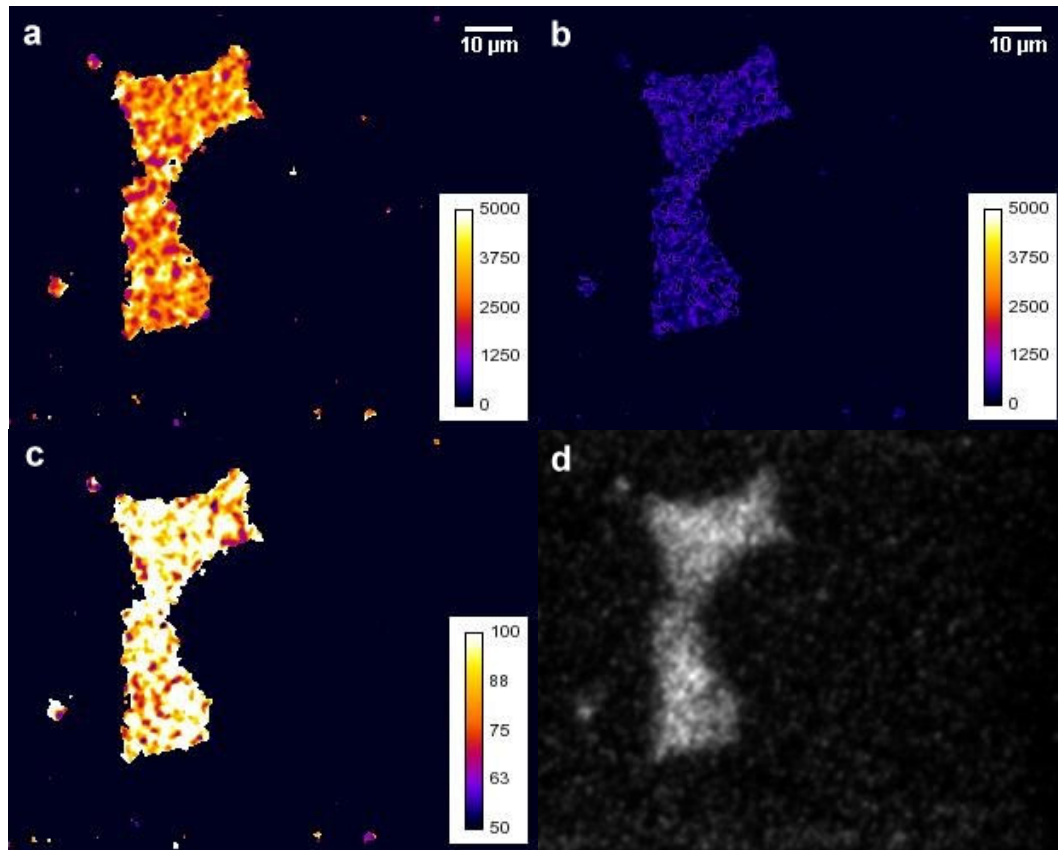


Abbildung 6.9 FLIM-Aufnahme einer MIN6 β -Zelle bei Umströmung mit glucosefreier Krebs-Ringer-Lösung. Bild a zeigt die proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer, Bild b die des freien NAD(P)H (beide Skalierungen in ps). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent.

Das freie NAD(P)H hat die erwartete Fluoreszenzlebensdauer von etwa 400 ps. Der hohe Anteil an gebundenem NAD(P)H überrascht, da in vorausgehenden Messungen (ohne Stimulation) der Anteil des proteingekoppelten NAD(P)H in der β -Zelle eher zwischen 50 bis 100% gut verteilt war. Es gab wenige Regionen in der Zelle aus denen die gesamte Fluoreszenzintensität aus proteingebundenem NAD(P)H herrührte, also bei 100% lag (siehe Abbildung 6.4 c). Diese β -Zelle war jedoch in einer Pankreasinsel und die Vitalität kann nur schwer abgeschätzt werden, da diese erst transportiert wurde und nicht unter optimalen Bedingungen vermessen werden konnte. Vergleicht man dies mit Bild c aus Abbildung 6.9, so erkennt man, dass über die meiste Fläche der Zelle verteilt das gesamte Signal von gebundenem NAD(P)H kommt. Es gibt nur einige wenige Orte in der Zelle (dunkle Bereiche), wo ein merklicher Anteil an freiem NAD(P)H zur Fluoreszenz beiträgt.

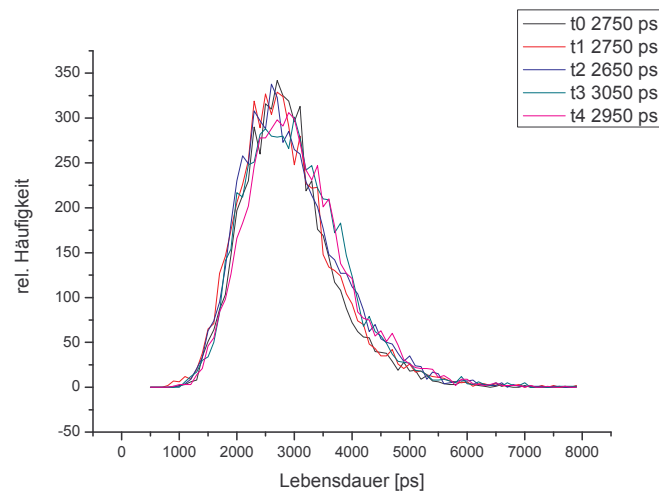


Abbildung 6.10 Fluoreszenzlebensdauerhistogramme aus proteingebundenen NAD(P)H-FLIM-Aufnahmen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten bei Umspülung mit glucosefreiem Medium (vgl. Bild a in Abbildung 6.9). Der Hauptanteil der NAD(P)H-Proteinkomplexe hat eine gemittelte Lebensdauer von $2,83 \pm 0,16$ ns.

Zeichnet man dieses in einem Histogramm auf (Abbildung 6.11), so wird dies nochmals verdeutlicht:

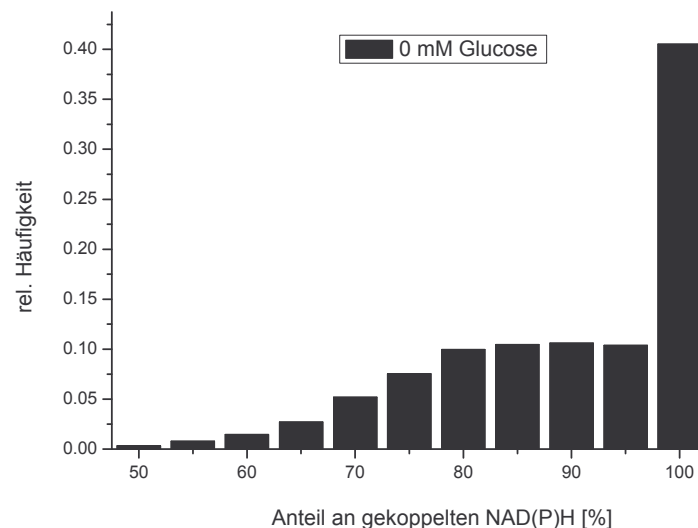


Abbildung 6.11 Histogramm über die örtliche Verteilung des Signalanteils der Fluoreszenz, das durch proteingebundenes NAD(P)H hervorgerufen wird. Messung bei Umströmung mit glucosefreier Krebs-Ringer-Lösung. Histogramm erzeugt aus Abbildung 6.9 c und in 5 Prozentschritte eingeteilt.

Da die Zellen mit glucosefreiem Medium umspült werden und sich in einer Art Hungerstadium befinden, ist es abzuwarten, wie sie auf eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Hinblick auf freies und gekoppeltes NAD(P)H reagieren. Mögliche Reaktionen wären z.B. verän-

derte Proteinkopplungen, die die Fluoreszenzlebensdauer des gebundenen NAD(P)H verlängern oder verkürzen. Dies könnte nur an speziellen Zellbereichen stattfinden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich der Anteil des gebundenen NAD(P)H verringert oder gar vergrößert.

Die Antwort gibt der Wechsel auf eine Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucose. Auf den ersten Anschein liegt in Abbildung 6.12 keine Veränderung vor. Was allerdings nur für die Lebensdauern der beiden Komponenten (frei und gebunden) zutrifft. Hier kann aber eine sehr wichtige Aussage schon getroffen werden. Würde sich das NAD(P)H bei der Stimulierung auch nur zu einem geringen Prozentsatz an andere Enzyme bzw. Proteine binden, so wäre dies mit einer veränderten Fluoreszenzlebensdauer belegbar. Die Fluoreszenzlebensdauer-histogramme aus der stimulierten Zelle zeigen aber die gleiche Verteilung (siehe Abbildung 6.13). Es sind also die gleichen Proteinbindungen. Sie sind nur augenscheinlich anders über die Zelle verteilt, was wiederum den Transport dieser verschiedenen Komplexe durch die Zelle aufzeigt.

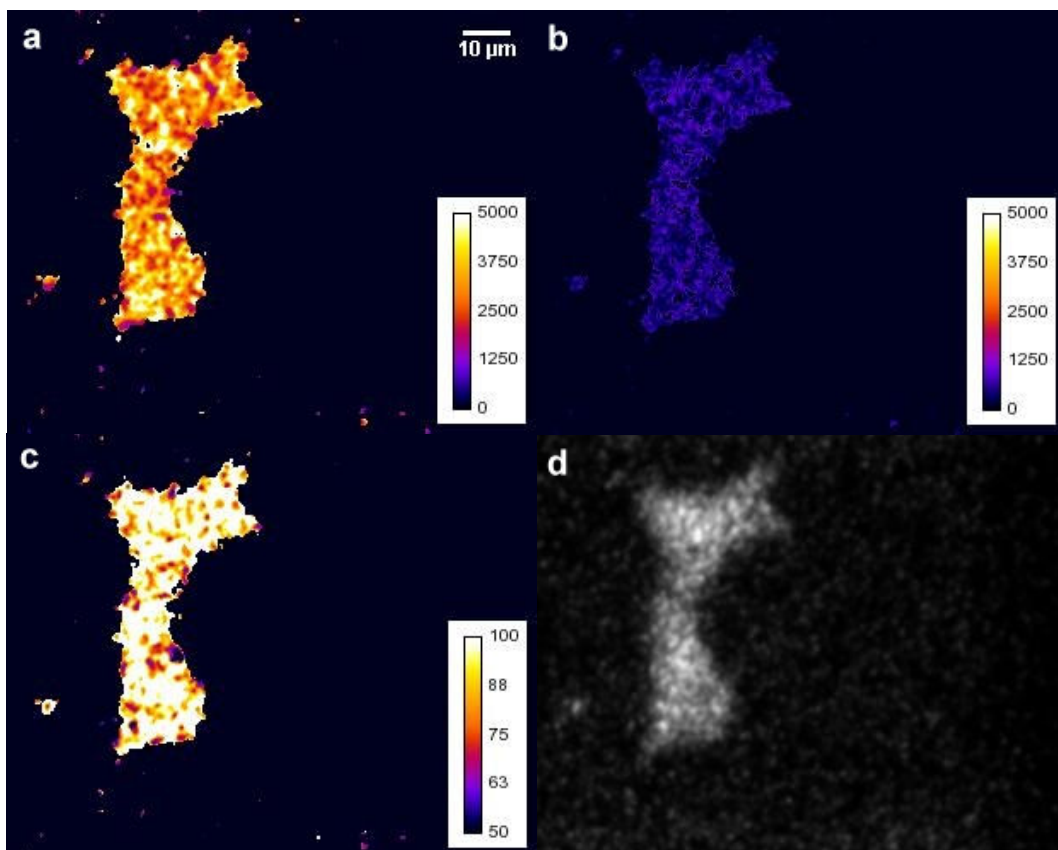


Abbildung 6.12 FLIM-Aufnahme der MIN6 β -Zelle bei Wechsel auf eine 20 mM Glucosekonzentration. Bild a zeigt die proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer, Bild b die des freien NAD(P)H (beide Skalierungen in ps). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent und Bild d ein Intensitätsbild.

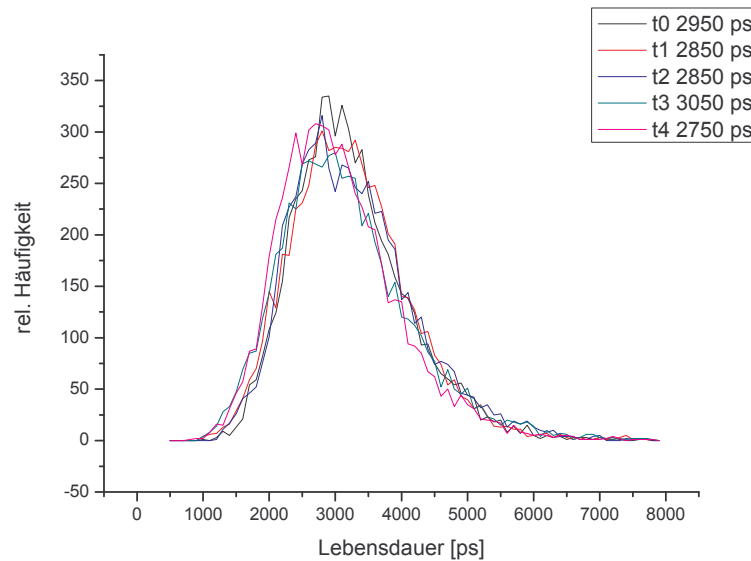


Abbildung 6.13 Fluoreszenzlebensdauerhistogramme aus proteingebundenen NAD(P)H-FLIM-Aufnahmen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten bei 20 mM Glucose. Der Hauptanteil der NAD(P)H-Proteinkomplexe hat eine gemittelte Lebensdauer von $2,89 \pm 0,11$ ns

Vergleicht man die Bilder c bei 0 mM und 20 mM Glucosekonzentration, bringt auch hier erst das Histogramm eine Aufklärung über eine mögliche Änderung. Zwar zeigt sich auch hier, wie man in Abbildung 6.14 sieht, dass das meiste Signal von gebundenem NAD(P)H resultiert, aber eine gemeinsame Auftragung der beiden Histogramme (Abbildung 6.11 und Abbildung 6.14) lässt hier einen deutlichen Trend erkennen.

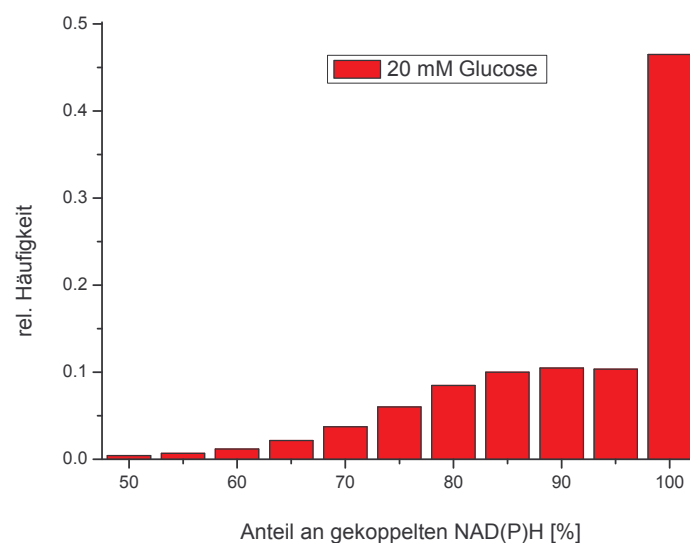


Abbildung 6.14 Histogramm über die örtliche Verteilung des Signalanteils der Fluoreszenz, das durch proteingebundenes NAD(P)H hervorgerufen wird. Messung bei Umströmung mit Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucose.

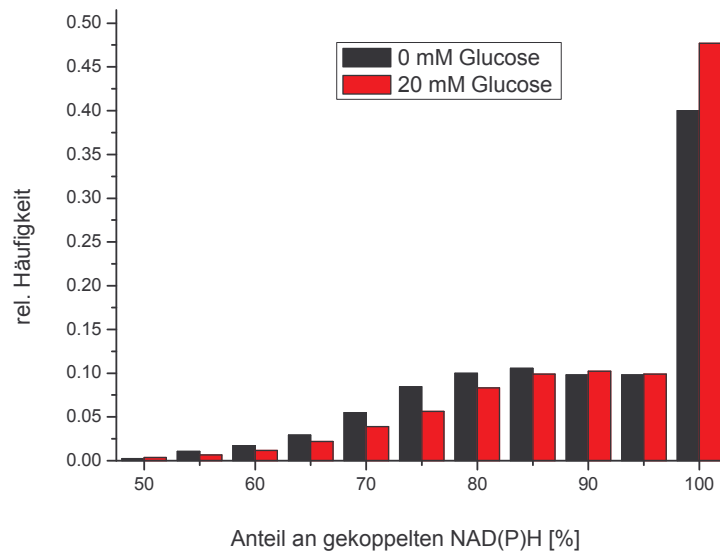


Abbildung 6.15 Änderung des Signalanteils an gekoppeltem NAD(P)H. Bei Anstieg von 0 auf 20 mM Glucose werden mehr NAD(P)H-Moleküle gekoppelt. Die Wertebereiche wurden auf 1 normiert.

In Abbildung 6.15 ist die Stimulierung der Zellen deutlich zu erkennen. Es werden bei der Glucosestimulation mehr NAD(P)H-Moleküle gebunden. Hier sind die Mittelwerte aus je 3 Histogrammen zu den jeweiligen Glucosekonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten gebildet worden und zusammen aufgetragen. Der Abstand der Einzelmessungen betrug exakt 60 Sekunden. Die Standardabweichung der Maximalwerte liegt bei diesen Messungen bei etwa einem Prozent.

Die Mittelwertbildung über verschiedene Zeitpunkte mit der geringen Standardabweichung zeigt die gute Reproduzierbarkeit der FLIM-Messungen. Dennoch soll eine zweite Probe der gleichen Zelllinie vermessen werden, um Artefakte auszuschließen. Diesmal in umgekehrter Reihenfolge der Stimulation, also mit einem Wechsel von 20 mM auf eine glucosefreie Krebs-Ringer-Lösung. Wie erwartet bietet sich einem ein Bild, ähnlich dem der ersten Messungen. Die Aufnahmen geben durch Ihre Auswertung mit Hilfe von Histogrammen Auskunft über die Verhältnisse zwischen freiem und gekoppeltem NAD(P)H. Diesmal ist sogar bei genauem Hinschauen eine Änderung in den Bildern c mit dem bloßen Auge zu erkennen. Bei Abnahme der Glucosekonzentration sinkt der Anteil an proteingebundenem NAD(P)H, was durch dunklere Regionen zu sehen ist.

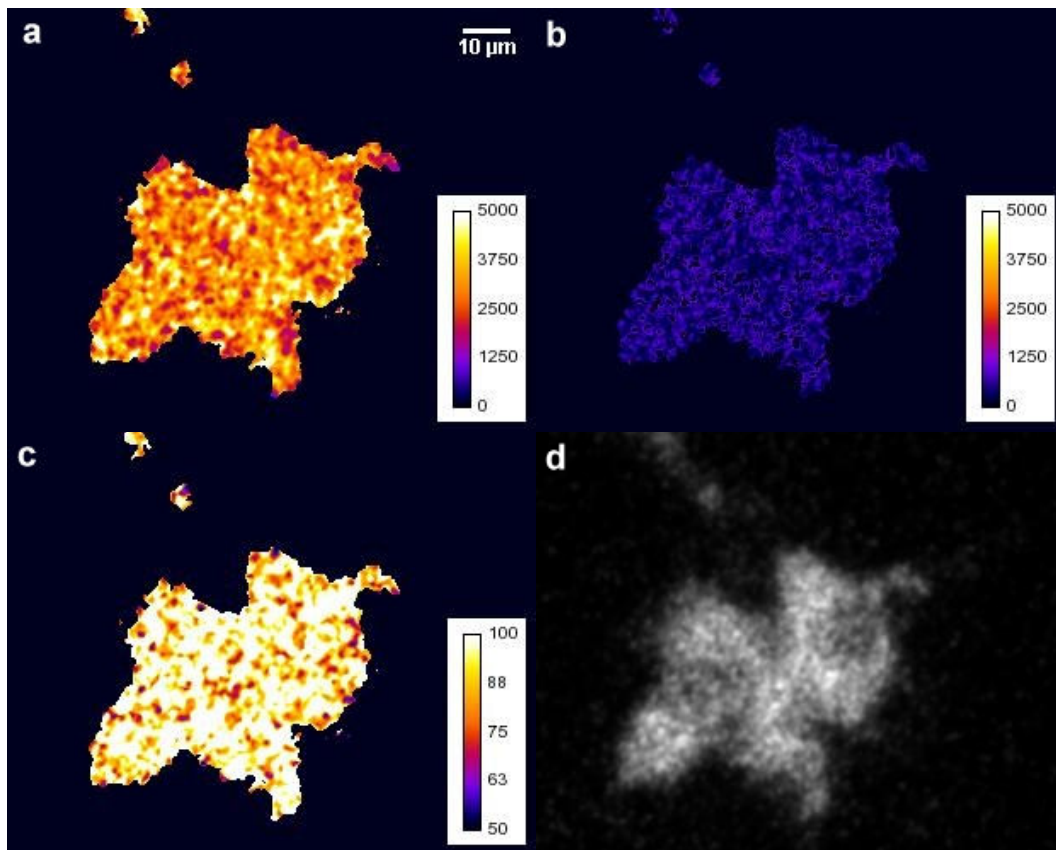


Abbildung 6.16 FLIM-Aufnahme einer MIN6 β -Zelle bei Umströmung mit einer Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucose. Gleiches Verfahren wie in Abbildung 6.9 und Abbildung 6.12. Proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer in ps (Bild a) und freies NAD(P)H (Bild b). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent.

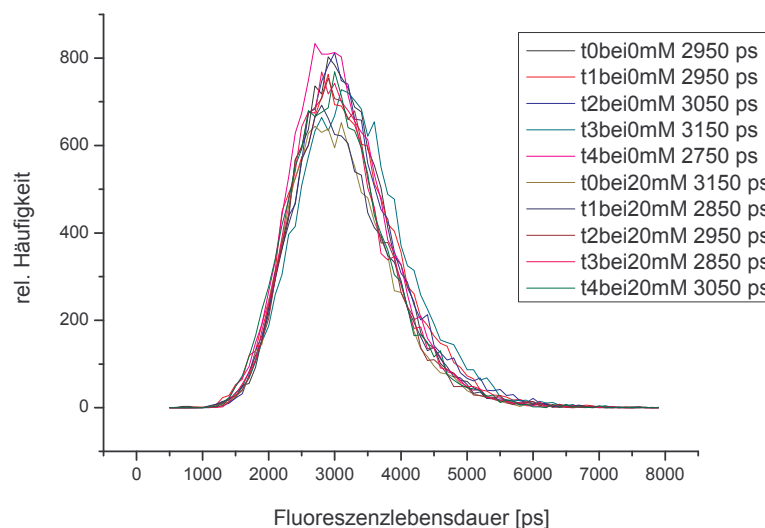


Abbildung 6.17 Fluoreszenzlebensdauerhistogramme aus proteingebundenen NAD(P)H-FLIM-Aufnahmen zu je fünf verschiedenen Zeitpunkten bei 20 mM und 0 mM Glucose. Der Hauptanteil der NAD(P)H-Proteinkomplexe hat eine gemittelte Lebensdauer bei $2,97 \pm 0,15$ ns für das freie und $2,97 \pm 0,13$ ns für das proteingebundene NAD(P)H

Die Fluoreszenzlebensdauerhistogramme des gekoppelten NAD(P)H zeigen auch hier keine merkliche Änderung. In Abbildung 6.17 sind je fünf Histogramme zu den jeweiligen Gluco-

sekonzentrationen, die in einminütigen Abständen aufgenommen worden sind, aufgetragen. Sie liegen nahezu übereinander. Die mittlere Lebensdauer bleibt bei ca. 3 ns konstant und damit immer noch relativ hoch. In einigen anderen Zelltypen die bisher vermessen wurden lag die mittlere Fluoreszenzlebensdauer bei gerade mal knapp über 2 ns.⁸³

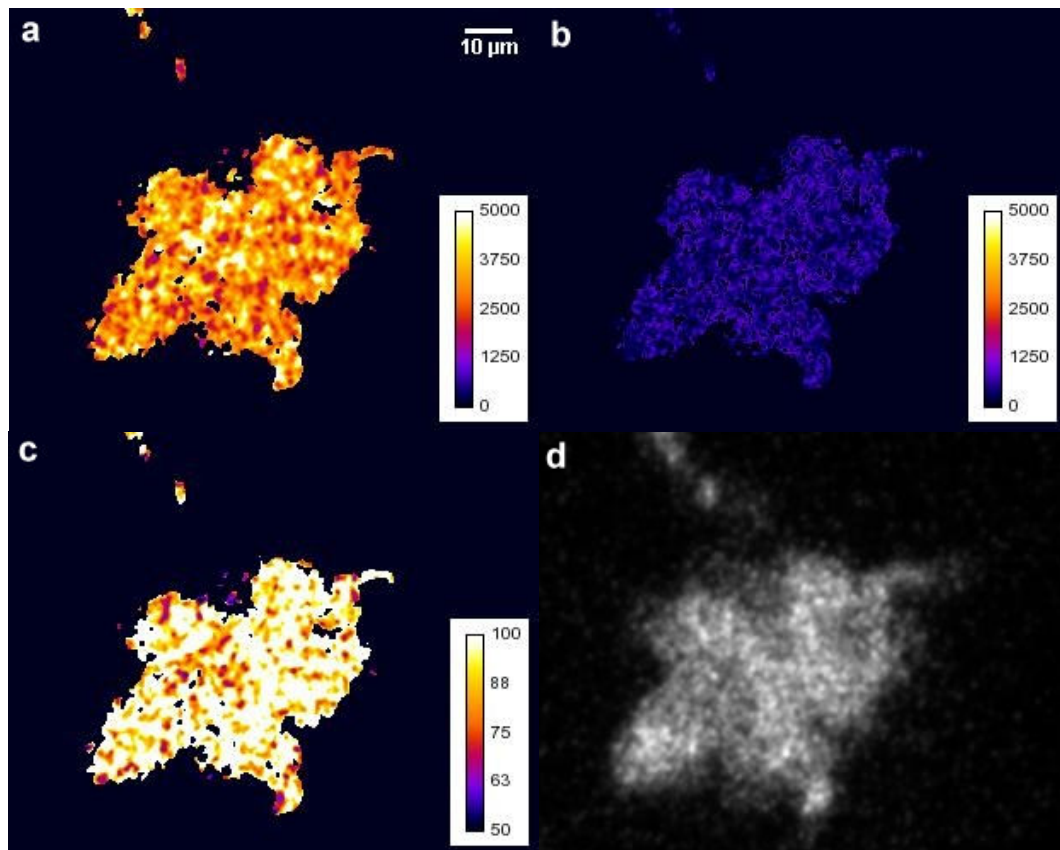


Abbildung 6.18 FLIM-Aufnahme einer MIN6 β -Zelle bei Umströmung mit glucosefreier Krebs-Ringer-Lösung. Proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer in ps (Bild a) und freies NAD(P)H (Bild b). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent.

Die Sicht auf die Balkendiagramme aus den Signalanteilbildern des gekoppelten NAD(P)H in Abbildung 6.19 zeigen erneut einen klaren Trend. Sinngemäß zur ersten Messreihe sinkt der Anteil an proteingekoppeltem NAD(P)H in der Zelle, wenn man die Glucosekonzentration verringert.

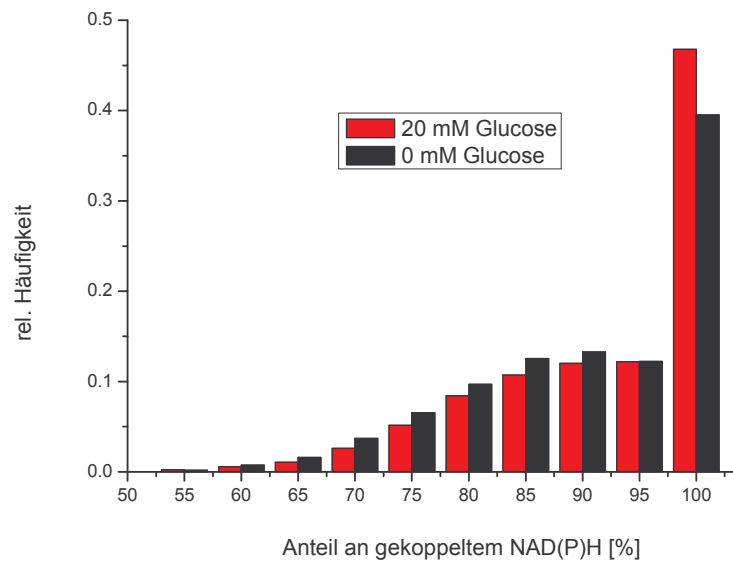


Abbildung 6.19 Änderung des Signalanteils an gekoppeltem NAD(P)H. Bei Rückgang der Glucosekonzentration von 20 auf 0 mM, werden analog zu ersten Messungen weniger NAD(P)H-Moleküle gekoppelt

Mit den vorgestellten Messungen, konnte erstmals ein getrenntes Verhalten zwischen freiem und gebundenem NAD(P)H durch Glucosestimulation gezeigt werden. Die Reversibilität des Verhältnisses (frei/ proteingebunden) konnte ebenso an dieser Stelle demonstriert werden. Dieses Auswerteverfahren erlaubt zudem die Aussage, dass bei Glucosestimulation nicht erst NAD(P)H-Proteinbindungen geknüpft werden müssen, die vorher nicht vorhanden sind, sondern es zu einer Art Mobilisierung der „letzten Reserven“ kommt. Der ohnehin geringe Anteil an freiem NAD(P)H wird bei Stimulation demnach auch enzymgekoppelt, und zwar mit den gleichen Proteinen. Der allgemeine Anstieg der Fluoreszenz ist also das Binden des restlichen freien NAD(P)H. So sind die Intensitätsbilder der MIN6 β -Zellen aus Kapitel 6.2 und deren Reaktion in ihrer Ursache näher erklärt worden.

7 Zwei-Farben Zwei-Photonen Frequenzmischung mit Femtosekundenlaserpulsen

Die Zweiphotonenmikroskopie ist nach heutigem Stand der Technik eine bereits etablierte und in vielen Laboratorien auf verschiedenste Weise benutzte Methode. Die Entwicklung dieser neuen Technik ging rasant voran. Jedoch ist es etwa 40 Jahre her, dass PETICOLAS et al.⁸⁴, MCCLAIN et al.^{85,86} und FRÖHLICH und MAHR⁸⁷ schon einige Experimente mit Zweiphotonenabsorption gemacht haben. Was jedoch an diesen Experimenten zu jener Zeit anders war, ist die Tatsache, dass mit Photonen unterschiedlicher Wellenlängen die ZPA realisiert wurde. Sie bestrahlten ihre Proben mit gepulsten Rubin- oder Neodymlasern und einer synchronisierten Bogenlampe*. Die Absorption von Photonen verschiedener Polarisationen des Lasers und der Bogenlampe wurde ausgenutzt, um Informationen über die Symmetrie des elektronischen Zustandes zu gewinnen (vgl. Kap. 2.3.2 über Auswahlregeln). Die Theorie dieser Zwei-Farben Zwei-Photonen (2C2P von *two-color two-photon*) Absorption wurde von MCCLAIN beschrieben und geprüft.^{88,89} Vor etwa 10 Jahren wurden diese Experimente wieder aufgegriffen, um es mit damals moderneren Lasern durchzuführen.⁹⁰ Hier wurden Pikosekunden Laserpulse der Wellenlängen 380 und 760 nm genutzt, um die 2C2P-Fluoreszenz an Indolen in Lösung zu zeigen.

Die Vorteile der „gewöhnlichen“ Ti:Sa-Zweiphotonenmikroskopie mit Photonen einer Wellenlänge sind auf Fluorophore beschränkt, die ihre maximale Absorption zwischen 370 und 500 nm erfahren. Ursache ist das nutzbare Anregungsspektrum eines Ti:Sa-Lasers das ca. zwischen 740 und 1000 nm liegt (vgl. Abbildung 2.3). Abhilfe können Lasersysteme schaffen die mit den Ti:Sa-Laserpulsen eine optisch parametrische Verstärkung (OPA, Optical Parametric Amplification) durchführen, und so mit Hilfe von nicht-linearen Effekten Femtosekundenpulse in einem Wellenlängenbereich von 500 bis 2200 nm erzeugen. Eine andere Möglichkeit unterhalb vom UV-Bereich Femtosekundenanregung per ZPA durchzuführen wäre eine 2C2P-Anregung. Eine SHG des Ti:Sa-Lasers würde je nach eingestellter Wellenlänge und BBO-Kristall fs-Laserpulse zwischen 370 und 500 nm erbringen, diese könnte man mit

* Bogenlampen sind Gasentladungsstrahler hoher Leuchtdichte durch Ausnutzung der Bogenentladung zwischen 2 Elektroden

der Fundamentalen zur Korrelation bringen und hätte nach Formel (7.1) einen neuen per ZPA erreichbaren Wellenlängenbereich für fs-Laserpulse erschlossen, der zwischen 247 und 333 nm liegt.

7.1 Die 2C2P Anregung

Die ZPA mit unterschiedlichen Photonenenergien wurde bereits in Abbildung 2.5 erwähnt. Die 2C2P Anregung ist lediglich ein Fall der resonanten ZPA, wo die beiden Anregungswellenlängen λ_1 und λ_2 ungleich und in folgenderweise mit der adäquaten Einphotonenanregungswellenlänge λ_e verknüpft sind:

$$\frac{1}{\lambda_e} = \frac{1}{\lambda_1} + \frac{1}{\lambda_2} \quad (7.1)$$

Eigentlich sollte man die einfarbige ZPA als einen Spezialfall der 2C2P-Anregung sehen, wo $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_e = \lambda_{2p}$ ist.⁹¹ CAMBALIZA und SALOMA sehen in 2C2P-gestütztem Imaging eine geeignete Methode, um mikroskopische Untersuchungen in stark streuenden Medien, wie z.B. in biologischem Gewebe, durchzuführen. Sie beschreiben ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber der einfarbigen ZPA. Dennoch ist die ZPA mit Photonen der gleichen Wellenlänge die Mikroskopieart, die sich durchgesetzt hat, was vor allem an der einfachen apparativen Durchführbarkeit liegt. Ein Femtosekundenlaser liefert hier schon die passenden Lichtquanten in gleicher Polarisation und der räumliche Überlapp stellt durch die intrinsische Kohärenz eines Laserstrahls keine Probleme dar. Eine einfache Linse oder Objektiv genügt für die gewünschte Zweiphotonenanregung.

Bei einer 2C2P-Anregung müssen hingegen die beiden Lichtquellen auf einander abgestimmt werden. Der apparative Aufwand ist bei diesem Experiment sehr groß, da hier Femtosekundenpulse örtlich und zeitlich überlappt werden müssen. Das heißt für den Experimentator, dass Spiegeljustagen auf wenige Mikrometer genau durchgeführt werden müssen. Effekte wie Pulsverzögerungen durch optische Bauelemente müssen bedacht werden. Es können zusätzliche Probleme wie z.B. chromatische Abberationen auftreten, wenn beide Farben durch die gleiche Optik geschickt werden. Die optische Kontrolle (z.B. an einem Mischkristall), ob eine Zeit-Raum-Überlagerung der Farben gelungen ist, kann aufgrund von gedrehten Polarisationen versagen.

ATP-Fluoreszenz als Anreiz

Die Motivation für ein 2C2P-Experiment stellt sich, trotz der aufgezählten Schwierigkeiten, in diesem Fall wie folgt dar. Eine Zweiphotonenanregung mit einem 800 und 400 nm Photon würde einer Einphotonenanregung bei ca. 266 nm entsprechen. Diese Wellenlänge scheint in Anbetracht des UV-VIS-Spektrums vom Adenosintriphosphat (ATP) sehr attraktiv, da in diesem Bereich der Adenosinanteil des Moleküls eine starke Absorption zeigt (Abbildung 7.1). Die ATP-Vorläufer Adenosindiphosphat (ADP) sowie das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) zeigen hier im Übrigen das gleiche Absorptionsverhalten wie das ATP.

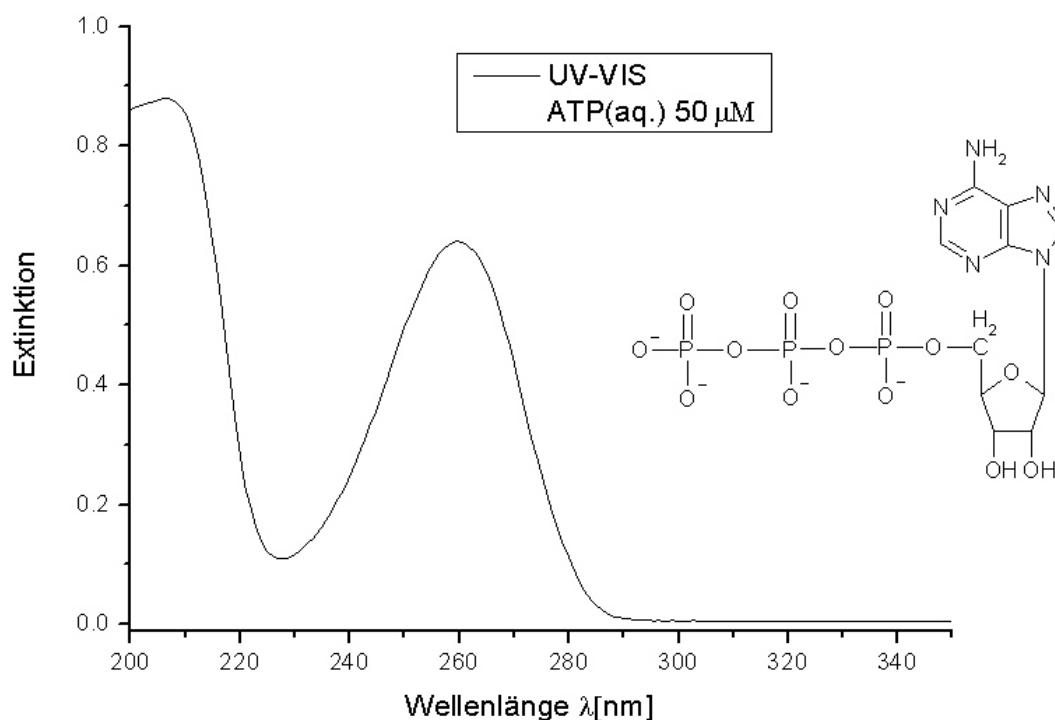


Abbildung 7.1 UV-VIS-Spektrum und Strukturformel des Adenosintriphosphats

Da das Molekül weder bei 400 noch bei 800 nm eine Absorption erfährt, soll hier eine 2C2P-Anregung eine neue Methode darstellen, dieses Molekül mit Femtosekundenpulsen anzuregen und seine Fluoreszenz mit hoher Zeitauflösung zu beobachten. Die Relevanz des ATP-Moleküls und dessen Funktion in allen lebenden Zellen ist unumstritten, und wurde bereits in Kapitel 6 erörtert. Eine direkte Einphotonenanregung bei dieser energiereichen Wellenlänge ist für Experimente an biologischen Proben ungeeignet, deswegen gab es immer wieder Versuche das ATP über Umwege (indirekte Fluoreszenz) zu visualisieren. So genannte Fluoreszenzsensoren die spezifisch an ATP koppeln sollen, sind hier für die Fluoreszenz ausgenutzt worden.⁹²

Die Vorteile des Imagings in biologischen Proben per ZPA könnten durch eine 2C2P-Anregung neben ATP auch auf viele weitere Biomoleküle ausgeweitet werden. An dieser Stelle wird das bestehende Zweiphotonenmikroskop zunächst genutzt, um eine Dreiphotonenanregung mit 800 nm (was ebenfalls einer EPA bei 266 nm entspricht) am ATP durchzuführen. Die direkte Fluoreszenz konnte an einer wässrigen ATP-Lösung (100 μM) gezeigt werden. Sie hatte eine kubische Fluoreszenzabhängigkeit von der Intensität, was die Dreiphotonenanregung bestätigt. Die Fluoreszenzlebensdauer konnte zu 439 ± 55 ps bestimmt werden (siehe Abbildung 7.2). Für Imagingexperimente ist diese Dreiphotonenanregung aber ungeeignet, da die Fluoreszenz nur als fokaler Punkt im ungescannten Betrieb registriert werden konnte. Eine früher durchgeführte Dreiphotonenanregung des p-Terphenyls aus Abbildung 2.9 war mit viel höheren Fluoreszenzintensitäten verbunden, was auf einen geringen Absorptionsquerschnitt des ATP schließen lassen kann. Da jedoch die ZPA um viele Größenordnungen wahrscheinlicher ist, darf eine stärkere Fluoreszenz bei einer 2C2P-Anregung erwartet werden.

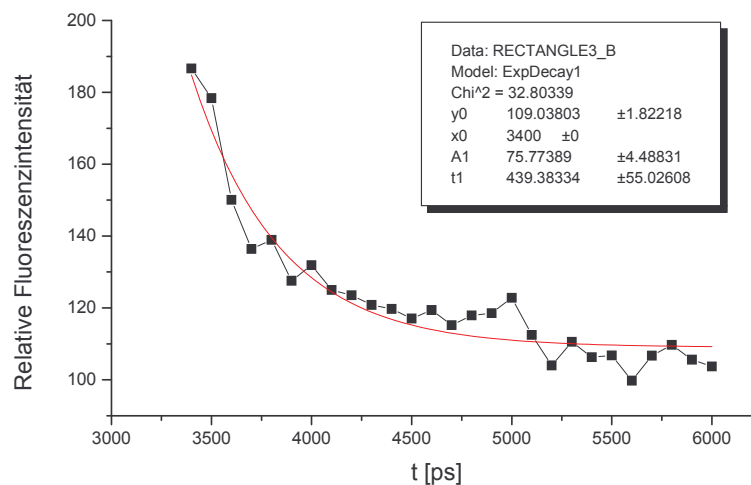


Abbildung 7.2 Fluoreszenzlebensdauer des ATP nach Dreiphotonenanregung. Sie beträgt 439 ± 55 ps

7.2 Apparative Realisierung

Im Folgenden wird das Experiment beschrieben, welches eine Zwei-Farben Zwei-Photonen Überlagerung mit Femtosekundenpulsen ermöglichen soll, um damit eine 2C2P Anregung an ATP durchzuführen. Der Aufbau lässt sich wie folgt beschreiben: Ein erster BBO-Kristall

verdoppelt die Frequenz des Lasers von 800 nm auf 400 nm. Frequenzverdopplerkristalle sind auf bestimmte Wellenlängen optimiert. Die Wahl eine zweite Harmonische von 800 auf 400 nm zu generieren, fiel auf Grund von Vorüberlegungen über das UV-VIS Spektrums des ATP und anhand der Tatsache, dass auch der Ti:Saphir-Laser seine maximale Leistung bei 800 nm zur Verfügung stellt (vgl. Abbildung 2.3). Es werden etwa 8% des Laserstrahls vom ersten BBO frequenzverdoppelt. Das erzeugte 400 nm Licht wird nun mit einem dichroitischen Spiegel von dem 800 nm Licht getrennt. Die beiden Farben gehen nun getrennte Wege und können einzeln durch optische Bauelemente modifiziert werden. Eine Trennung der beiden Farben ist notwendig, da das frequenzverdoppelte Licht zum einen in einer gedrehten Polarisation erzeugt wird und zum anderen der zeitliche Versatz der Pulse ausgeglichen werden muss. Eine 2C2P-Anregung mit variabler Polarisation der beiden Photonen bietet mehr Untersuchungsmöglichkeiten, weswegen die Polarisation des roten Laserlichts mit einer $\lambda/2$ -Platte angepasst werden kann. Durch die Trennung der Laserpulse ergibt sich das Problem der erneuten zeitlichen und örtlichen Überlagerung. Da die Pulse ca. 200 fs schmal sind, muss man hier ein Fenster suchen, das etwa 60 μm breit ist. Mit bloßem Auge und Maßstab kann man die Spiegel im Aufbau nur etwa auf einige Millimeter genau justieren, deswegen hilft ein motorisierter Tisch (linear stage) dieses Fenster zu finden.

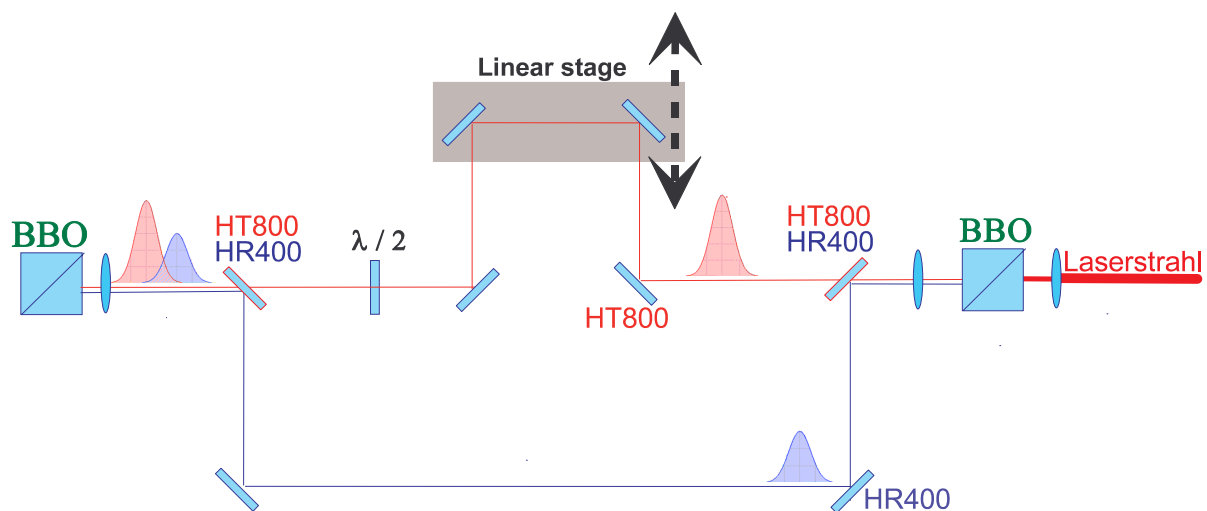


Abbildung 7.3 Aufbau für eine Zwei-Farben Zwei-Photonen Überlagerung mit Femtosekundenpulsen.

Ein zweiter BBO dient zunächst als „Mischkristall“, um zu erkennen, ob die zeitliche und örtliche Überlagerung gelungen ist. Wenn dem so ist, wird in diesem zweiten BBO Licht der Wellenlänge 266 nm erzeugt. Ein Fluorophor, der bei dieser Wellenlänge stark absorbiert (in diesem Fall Furan 2) und eine sichtbare Fluoreszenz zeigt, dient dann hinter dem zweiten

BBO als Indikator. Die blauen 400 nm Laserpulse bleiben bis zur Wiedervereinigung am zweiten Dichroiten unverändert.

7.3 Ergebnisse

Eine erfolgreiche Überlagerung von 800 und 400 nm Femtosekundenpulsen konnte realisiert werden. Im zweiten BBO wurde eine Frequenzmischung der Fundamentalen und der zweiten Harmonischen zu 266 nm durchgeführt. Beim Platzieren einer Küvette mit wässriger ATP-Lösung in den 266 nm Strahl, konnte eine sehr schwache Fluoreszenz registriert werden (zunächst also per Einphotonenanregung). Mit dem Furan 2 war die Fluoreszenz dagegen relativ stark. Dabei wurde jeweils das noch vorhandene 400 und 800 nm Licht hinter dem Mischkristall mit einem Interferenzfilter abgeblockt, um nur das 266 nm Licht passieren zu lassen. Um eine direkte Zwei-Farben Zwei-Photonen Anregung durchzuführen, wurde der zweite BBO aus dem Aufbau entfernt und die Küvette mit der entsprechenden anzuregenden Substanz an diese Stelle positioniert. Die Fluoreszenz des Furan 2 durch 2C2P-Anregung konnte immer noch mit bloßem Auge wahrgenommen werden. Die des ATP jedoch nicht mehr, da das 400 nm Streulicht stärker als die eigentliche Fluoreszenz war und nicht effektiv genug getrennt werden konnte und das Fluoreszenzsignal „überblendete“.

Die sehr schwache Fluoreszenz des ATP war der Anlass, um das Fluoreszenzverhalten des ATP nochmals detaillierter zu untersuchen. Aufnahmen an einem Fluoreszenzspektrometer brachten hier ein unerwartetes Verhalten zu Tage. Während das ATP bei seinem Extinktionsmaximum bei 266 nm lediglich eine sehr schwache Fluoreszenz zeigt, scheint es bei 290 nm ein Maximum in Bezug auf seine Fluoreszenzanregung durchzulaufen (siehe Abbildung 7.4). Dies ist mit der klassischen Spektroskopie nicht zu erklären, da die maximale Fluoreszenzanregung normalerweise auch am Extinktionsmaximum stattfindet.

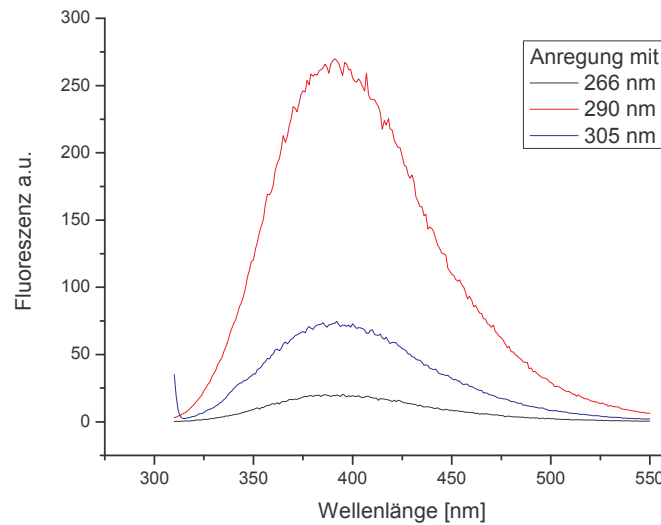


Abbildung 7.4 Fluoreszenz des ATP bei Anregung mit 3 unterschiedlichen Wellenlängen. Unerwartet tritt die stärkste Fluoreszenz bei ca. 290 nm auf.

Hier stellt sich die Lage jedoch so dar, dass die maximale Absorption in einem Bereich stattfindet, in dem laut UV-VIS-Aufnahme so gut wie keine Absorption mehr vorliegt (vgl. Abbildung 7.1 und Abbildung 7.4). Dieses anormale Bild wiederholt sich auch für die Auswertungen des ADP und AMP. Jedoch konnte mit dem aufgebauten System, dass aufgrund der gewählten BBO-Kristalle auf die 266 nm Anregung festgelegt war, die generelle Durchführbarkeit einer solchen Zwei-Farben Zwei-Photonen Anregung gezeigt werden. Ein weiterer Ausbau des 2C2P-Systems wurde zunächst nicht mehr durchgeführt. Eine Wartung und Grundjustage des Ti:Saphir-Lasers hat zudem die sensible örtliche und zeitliche Überlagerung der beiden Farben zerstört, so dass der gezeigte Aufbau aus Abbildung 7.3 mit seinen über ein Dutzend optischen Bauelementen Schritt für Schritt neu justiert werden muss. Hierbei würde sich ein BBO für die SHG von 850 auf 425 nm empfehlen, um näher an das festgestellte Fluoreszenzanregungsmaximum von 290 nm zu rücken, um so ein stärkeres Fluoreszenzsignal des ATP zu erhalten.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Kombination aus Femtosekundenlaser und Mikroskop-Kamera-System konnte ein hochsensitives, bildgebendes Verfahren und das so genannte Molecular Imaging realisiert werden, und so gezeigt werden, dass es für Untersuchungen an biologisch relevanten Fragestellungen sehr gut geeignet ist. Zudem konnten erstmals hochaufgelöste, dreidimensional gerenderte Bilder von biologischen Zellen mit reiner Autofluoreszenz, also ohne Eingriff in Form von Anfärbung, verwirklicht werden.

Obwohl es mittlerweile viele kommerziell erhältliche Zweiphotonenmikroskopiesysteme gibt, sind es doch immer wieder Detailverbesserungen an Laborprototypen, die die Methode immer weiter verbessern. So auch in unserem Fall, wo die Einbindung eines schnellen, nicht-iterativen, biexponentiellen Auswerteverfahrens für die FLIM-Aufnahmen, einen enormen Geschwindigkeitsvorteil bei der Datenanalyse bringt.

Die vorgestellten 3-D-Hautkonstrukte wurden auf Ihre Eignung als Hautersatz im Hinblick auf ihren Säurecharakter untersucht. Hierbei wurde das Molecular Imaging, das die konventionelle Bildgebung mit speziellen Fluorophoren erweitert und so bestimmte Parameter in und um Zellen sichtbar macht, eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die gezüchteten Hautkonstrukte, wie die Humanhaut einen differenzierten Säurecharakter besitzen und in dieser Hinsicht als Dermisäquivalente für Untersuchungen genutzt werden können. Hierbei konnte der pH-Wert in der Haut unter Beachtung der unterschiedlichen Brechungsindizes erstmalig und dreidimensional aufgelöst verfolgt werden. Die Bedeutung und Aktualität des Themas um Hautmodelle zeigen tief greifende Änderungen in der Kosmetik- und Chemikalienpolitik der EU, die tierversuchsfreie Methoden zur Abschätzung des Gefährdungspotenzials von Substanzen gesetzlich verankern.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die Effekte eines physiologischen Stimulators (der Glucose) auf Stoffwechselebene erfasst und visualisiert. Dies geschah in den β -Zellen (B-Zellen) der Pankreas, die für die Insulinsekretion verantwortlich sind. In Anbetracht der genetischen Vorbestimmtheit des Typ II Diabetes, ist eine differenzierte Analyse der B-Zellfunktion erforderlich, um den Beitrag einzelner Mutationen zu funktionellen Defizienzen zu erfassen. Die differenzierte Analyse wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der endogenen NAD(P)H-Fluoreszenz durchgeführt. Neben der bildgebenden „online“-Verfolgung der sich ändernden NAD(P)H-Fluoreszenzintensität, konnte eben diese Änderung auch „en détail“ auf das Mobilisieren und Binden von restlichem, freiem NAD(P)H zurückgeführt werden. Weiterhin konn-

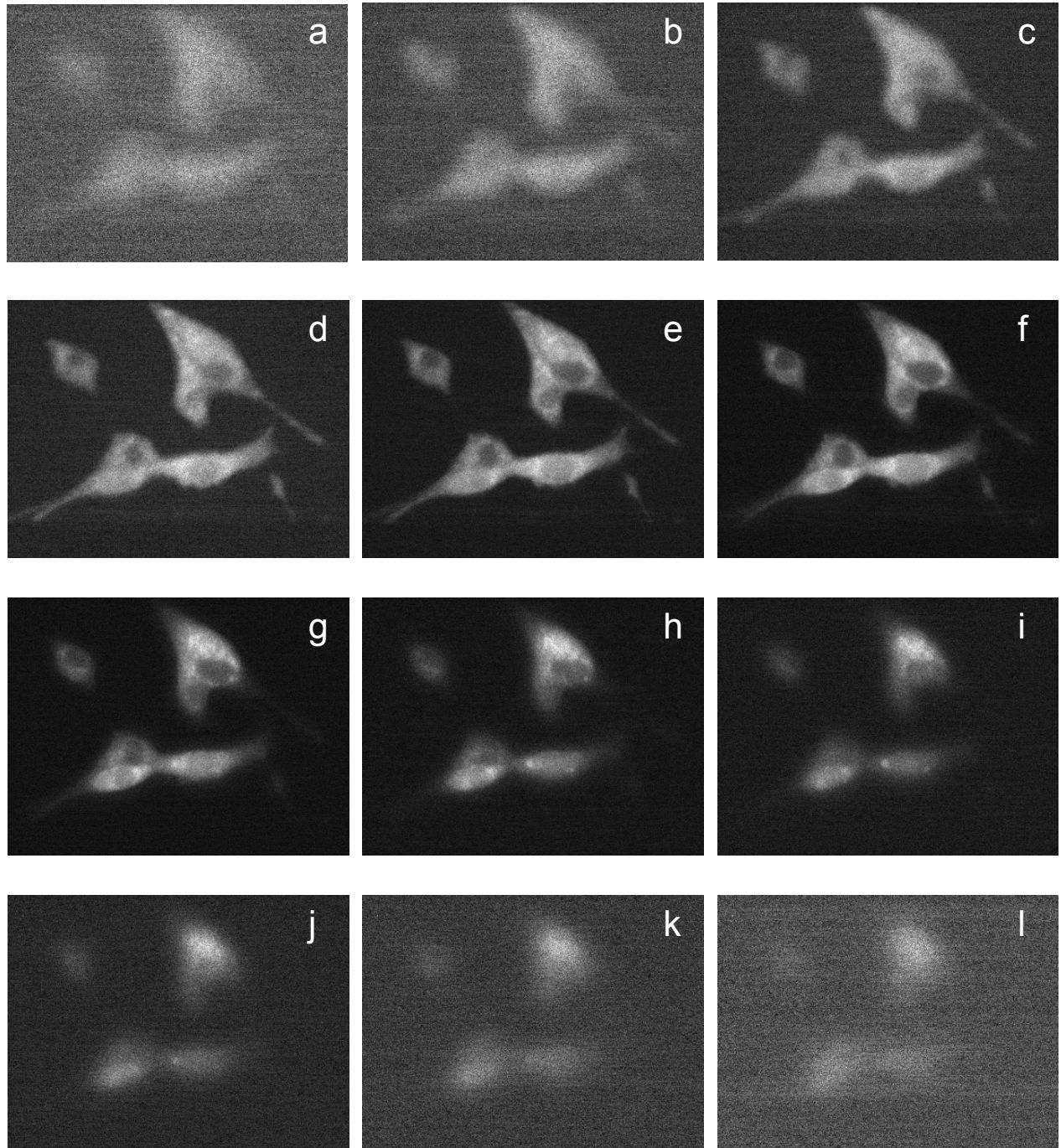
te auf Grund der gleich bleibenden Fluoreszenzlebensdauer des proteingebundenen NAD(P)H, die Aussage getroffen werden, dass es sich bei der glucosestimulationsbedingten Erhöhung des gebundenen NAD(P)H-Anteils um Bindungen an dieselben Proteine handelt. Es werden also bei Insulinausschüttung keine NAD(P)H-Enzymbindungen eingegangen, die vorher nicht vorhanden sind.

Bildgebungsverfahren leisten schon heute bei der Früherkennung von Krankheiten wertvolle Dienste, allerdings erst dann, wenn schon Symptome wie veränderte Blutwerte oder schon Tumore vorliegen. Die Diagnostik der Zukunft wird bereits molekulare Stoffwechselveränderungen verstehen und so Krankheitszeichen sehr viel früher erkennen. Mit Hilfe der entwickelten Methode, vor allem aufgrund ihrer Schnelligkeit, wird es möglich sein, funktionelle Untersuchungen „in situ“ und „in vivo“ vorzunehmen. Künftig könnten Ärzte z.B. Diabetes um Jahre früher diagnostizieren. Aber auch andere Zellparameter wie Ca^{2+} -Konzentrationen oder direkte ATP/ADP-Verhältnisse könnten mit dem Molecular Imaging besser verstanden werden. Diese viel versprechende Methode des Molecular Imaging ist natürlich auch an die Entwicklung spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Das große Potenzial ist hier längst erkannt und es gibt viele Arbeiten auf diesen Gebieten.^{93, 94, 95}

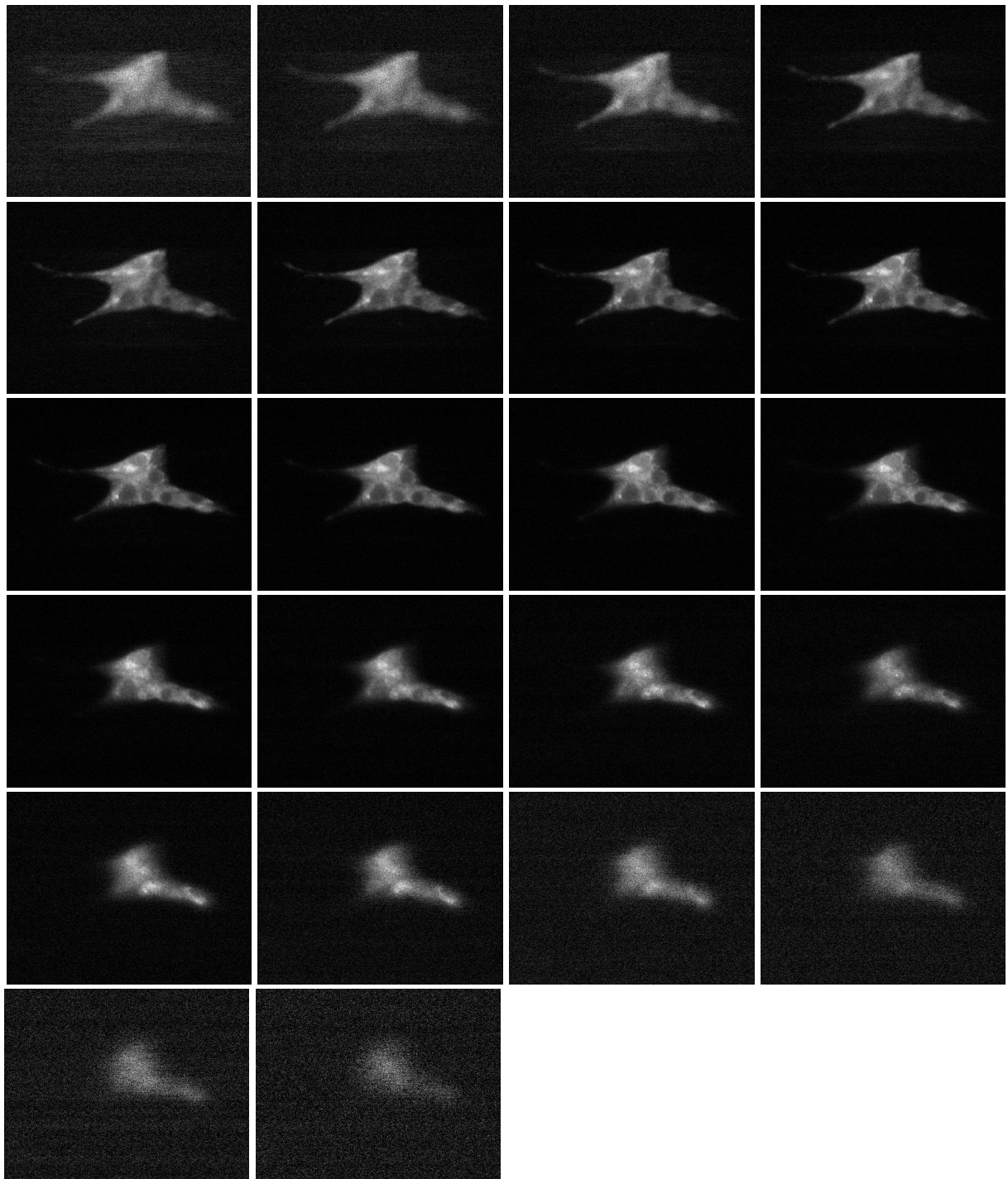
Um das ATP direkt und gewebeschonend mit Hilfe der Eigenfluoreszenz zu detektieren, wuchs die Idee eines Zwei-Farben Zwei-Photonen Aufbaus mit dem Ti-Saphir-Laser. Die Grundidee der zeitlichen und örtlichen Überlagerung von Femtosekundenpulsen der Fundamentalen und zweiten Harmonischen ist dabei gelungen. Ebenso gelang die direkte Zwei-Farben Zwei-Photonen Anregung von Furan 2, bei ATP steht dies noch aus. Die Ursache lag in dem unerwartet vom UV-VIS abweichenden Anregungsspektrum, das erst nach dem Aufbau zur 266 nm Frequenzmischung aufgenommen wurde. An diesem kann man erkennen, dass in diesem Wellenlängenbereichbereich, die Fluoreszenz des ATP relativ schwach ist. Ein erneuter Aufbau mit BBO-Kristallen für den geeigneten Wellenlängenbereich, kann hier bessere Resultate bringen. Ein denkbare Imagingverfahren per Zwei-Farben Zwei-Photonen Anregung wäre ein ganz neues Kapitel in der zeitlich aufgelösten Fluoreszenzmikroskopie.

Anhang

A.1 Tiefenscan durch eine MIN-6 β -Zelle



A 1 Tiefenscan durch eine MIN-6 β -Zelle von a nach l in 1 μ m Schritten



A 2 Tiefenscan durch eine MIN6 β -Zelle in 22 Einzelschritten mit $1\mu\text{m}$ Abständen

A.2 Python-Programm für die biexponentielle Auswertung

Im Folgenden ist das biexponentielle Auswerteprogramm abgedruckt. Es ist mit Python 2.3 erstellt worden.

```

from Numeric import *
from glob import *
import TableIO
import os
import string

#####
# Input from the keyboard #
#####
threshold = float(raw_input('Please enter the threshold > '))
dt = float(raw_input('Please enter the time step > '))

#####
# Read in the intensity matrices from the time-stack #
#####
a = glob("*_*.txt")
b = len(a)
reshape1 = []
reshape2 = []
splitVector = []
index = []
newOrder = [None]*len(a)
for i in range(len(a)):
    reshape1.append(string.replace(a[i],'_',' '))
    reshape2.append(string.replace(reshape1[i],',',' '))
    splitVector.append(string.split(reshape2[i]))
    index.append(string.atoi(splitVector[i][1]))
    newOrder[index[i]] = a[i]
print newOrder
#
datalist=[]
for i in range(b):
    data = TableIO.readTableAsArray(newOrder[i], '#')
    datalist.append(data)

#####
# Create the time vector #
#####
t = []
for i in range(b):
    t.append(i*dt)

```

```

#####
# Calculate the parameters of the biexponential fit using the Prony method #
# Select the reasonable lifetime values #
#####
time = len(datalist)
x = len(datalist[0])
y = len(datalist[0][0])
#
summ1_v = zeros((x,y),Float)
summ2_v = zeros((x,y),Float)
summ3_v = zeros((x,y),Float)
summ4_v = zeros((x,y),Float)
summ5_v = zeros((x,y),Float)
#
for i in range(time - 2):
    summ1_v += datalist[i + 1]*datalist[i + 1]
    summ2_v += datalist[i + 1]*datalist[i]
    summ3_v += datalist[i]*datalist[i]
    summ4_v -= datalist[i + 2]*datalist[i + 1]
    summ5_v -= datalist[i + 2]*datalist[i]
#
det_v = summ3_v*summ1_v - summ2_v*summ2_v
#
det_vd = det_v + equal(det_v,0.0)
#
s1 = not_equal(det_v,0.0)*((summ3_v*summ4_v - summ2_v*summ5_v)/det_vd)
s2 = not_equal(det_v,0.0)*((summ1_v*summ5_v - summ2_v*summ4_v)/det_vd)
#
delta = s1*s1 - 4.0*s2
#
delta_1 = greater(delta,0.0)*delta
delta_2 = equal(delta,0.0)
#
v1 = (-s1*(greater(delta,0.0) + delta_2) - sqrt(delta_1))/2.0
v2 = (-s1*(greater(delta,0.0) + delta_2) + sqrt(delta_1))/2.0
#
xx = []
yy = []
#
summ1_c = zeros((x,y),Float)
summ2_c = zeros((x,y),Float)
summ3_c = zeros((x,y),Float)
summ4_c = zeros((x,y),Float)
summ5_c = zeros((x,y),Float)
#
for i in range(time):
    xx.append(power(v1,i))
    yy.append(power(v2,i))
    summ1_c += xx[i]*xx[i]
    summ2_c += xx[i]*yy[i]
    summ3_c += yy[i]*yy[i]

```

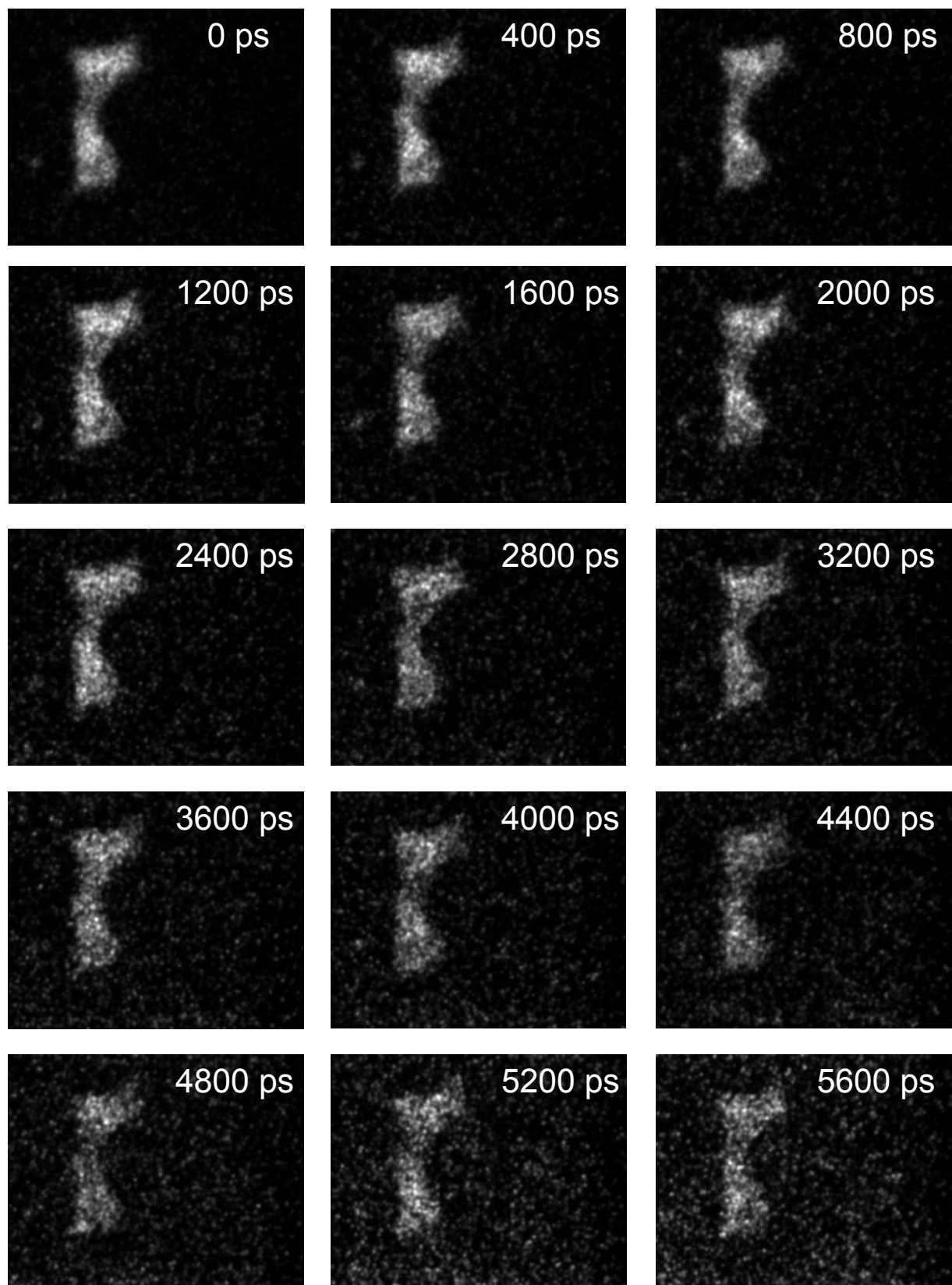
```

    summ4_c += datalist[i]*xx[i]
    summ5_c += datalist[i]*yy[i]
#
det_c = summ3_c*summ1_c - summ2_c*summ2_c
#
det_cd = det_c + equal(det_c,0.0)
c1 = not_equal(det_c,0.0)*((summ4_c*summ3_c - summ2_c*summ5_c)/det_cd)
c2 = not_equal(det_c,0.0)*((summ1_c*summ5_c - summ2_c*summ4_c)/det_cd)
#
tauf1 = log(fabs(not_equal(v1,1.0)*v1 + (equal(v1,1.0) + equal(v1,0.0))*2.0))
tauf1 = -dt/(not_equal(tauf1,0.0)*tauf1 + equal(tauf1,0.0))
tauf1 = greater(datalist[0],threshold)*greater(tauf1,50.0)*less(tauf1,1000.0)*tauf1
a1 = greater(c1,0.0)*not_equal(v1,0.0)*not_equal(v1,1.0)*c1
#
tauf2 = -dt/log(fabs(not_equal(v2,1.0)*v2 + (equal(v2,1.0) + equal(v2,0.0))*2.0))
tauf2 = greater(datalist[0],threshold)*greater(tauf2,500.0)*less(tauf2,8000.0)*tauf2
a2 = greater(c2,0.0)*not_equal(v2,0.0)*not_equal(v2,1.0)*c2
#
ampli = a2*tauf2*100.0/(a2*tauf2 + equal(a2*tauf2,0.0) + a1*tauf1)

# #####
# Output of the lifetime matrices and of the ratio matrix #
# #####
fina = raw_input('Please enter OUTPUT FILEMANE > ')
filename1 = fina + ' tau1.txt'
filename2 = fina + ' tau2.txt'
filename3 = fina + ' ratio.txt'
open(filename1,'w').write('#DaVis 6.2.4 2D-image ' + str(y) + ' ' + str(x) + ' ' + str(y) + ' 1 0 "'
"pixel" 1 0 "' "pixel" "" "counts"\n')
open(filename2,'w').write('#DaVis 6.2.4 2D-image ' + str(y) + ' ' + str(x) + ' ' + str(y) + ' 1 0 "'
"pixel" 1 0 "' "pixel" "" "counts"\n')
open(filename3,'w').write('#DaVis 6.2.4 2D-image ' + str(y) + ' ' + str(x) + ' ' + str(y) + ' 1 0 "'
"pixel" 1 0 "' "pixel" "" "counts"\n')
TableIO.writeArray(filename1,tauf1,'w')
TableIO.writeArray(filename2,tauf2,'w')
TableIO.writeArray(filename3,ampli,'w')

```

A.3 Intensitätsbilder für eine FLIM-Auswertung



A 3 Intensitätsbilder in äquidistanten Zeitabständen nach dem Laserpuls

Danksagung:

Ich bedanke mich bei all jenen Personen, die mir bei der Erzeugung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dabei geht mein besonderer Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Karl-Heinz Gericke für die interessanten Aufgabenstellungen und hilfreichen Diskussionen.

Der gesamten Arbeitsgruppe sei für die gute Atmosphäre gedankt, aus der viele Freundschaften wuchsen. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Raluca Niesner, die mir bei allen Fragen bezüglich der Zweiphotonenmikroskopie und der Mathematik stets weiterhelfen konnte. Prof. Dr. Ingo Rustenbeck und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die interessante Kooperation und Unterstützung.

Den Herren Peter Ahrens, Thorsten Himstedt, Manfred Hilpert und Bernd Sladeczek sei für die angefertigten Mechanik- und Elektroarbeiten gedankt. Der GBF (jetzt Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) möchte ich für die zur Verfügung Stellung des TrimScope danken.

Meiner Freundin Anna-Sophie Voß danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und ihr langjähriges Begleiten während meiner gesamten Studienzeit. Meiner Familie und meinen Freunden gilt der Dank für die Unterstützung, wo sie ihnen möglich war.

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1 Strukturformel des NADH, sein Coenzym (NADPH) hat an der rot markierten Stelle eine Phosphatgruppe	5
Abbildung 2.1 Erzeugung der zweiten Harmonischen in einem nichtlinearen Medium.....	11
Abbildung 2.2 Wellenlängenspektrum verschiedener Laser (Angaben in μm)	12
Abbildung 2.3 Absorptions- und Emissionsspektrum eines Titan-Saphir-Kristalls	13
Abbildung 2.4 Zeitlicher Verlauf der Laserausgangsleistung (a) ohne und (b) mit Modenkopplung (die gemittelte Leistung I_{m} ist in beiden Fällen dieselbe, man beachte die massiv unterschiedliche Skalierung)	14
Abbildung 2.5 Übergänge bei Mehrphotonenprozessen ²⁶ (I) Raman-Streuung, (II) ZPA mit gleicher Photonenenergie, (III) ZPA mit unterschiedlicher Photonenenergie, (IV) Dreiphotonenabsorption.....	16
Abbildung 2.6 Anregungsvolumen bei EPA (oben) und ZPA (unten, siehe Pfeil) im Vergleich. Bei der ZPA gibt es eine quadratische Abhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit von der Intensität. Dadurch wird ein sehr kleines Volumen in der Probe zur Fluoreszenz angeregt.	17
Abbildung 2.7 Absorptions- (EPA) und Emissionsspektrum von Rhodamin 6G.....	19
Abbildung 2.8 Jablonski-Schema. Relaxationsprozesse: K_{ISC} Intersystem Crossing, K_{IC} Internal Conversion, K_{F} Fluoreszenz, K_{P} Phosphoreszenz. δ und σ stellen die Absorptionsquerschnitte bzw. als Produkt mit ϕ die Übergangsrate dar.....	21
Abbildung 2.9 Drei-Photonen-Anregung des p-Terphenyls mit ca. 800 nm bei verschiedenen Laserleistungen	23
Abbildung 2.10 mono- (links) und biexponentielle (rechts) Abklingkurven der Fluoreszenz mit jeweils den logarithmierten Auftragungen darunter	25
Abbildung 2.11 Rhodamin 123 UV-VIS-/ Fluoreszenz-Spektrum	28
Abbildung 2.12 Strukturformel des Coumarin 153	28
Abbildung 2.13 Blauverschiebung der Absorption bei einer ZPA. Das UV-VIS-Spektrum (oben) lässt eine gute ZPA bei etwa 850 nm vermuten, der maximale Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt ist aber durch vibronische Kopplungen blauverschoben (zum besseren Vergleich wurde gegen $\lambda/2$ aufgetragen).	29
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Zweiphotonen-Laser-Rastermikroskops.....	31
Abbildung 3.2 Strahlprofil durch eine Linse (oben) mit w_1 dem Radius des einfallenden Lichtes und $2 w_0$ dem Fokaldurchmesser. Unten die Anregungsfläche entlang der optischen Achse im fokussierten Laserstrahl mit der lateralen Ausdehnung Δz	33

Abbildung 3.3 Laterale Auflösung eines 63x Zeiss Objektivs bei ZPA mit 800nm an einem 0,5 μm großen Microbead. Der Graph zeigt ein Intensitätsprofil mit Gaußfit durch den abgebildeten Microbead.	34
Abbildung 3.4 Schema des Laserrasterfluoreszenzmikroskops	35
Abbildung 3.5 Schematischer Aufbau der LaVision PicoStar	36
Abbildung 3.6 Fluoreszenzabklingkurve für den Farbstoff Coumarin 153	37
Abbildung 3.7 Rendern eines FLIM aus Intensitätsbildern	38
Abbildung 3.8 Prinzip des TrimScopes. In der Mitte ein optisches Bauelement mit einer speziellen Beschichtung. R und S sind jeweils total reflektierende Spiegel. ⁴⁴	39
Abbildung 3.9 32 Foki eines TrimScopes in einer fluoreszierenden Probe (20x Objektiv, NA=0,95). Durch Zuschalten weiterer 32 wäre ein fluoreszierende Linie erzeugt, die schnell über die Probe bewegt werden kann.	40
Abbildung 3.10 MIN6 β -Zellen (Durchlichtaufnahme)	42
Abbildung 3.11 Prototyp einer Zellumströmungskammer für Mikroskopiezwecke. Hier kann ein geeignetes Medium die biologische Probe umströmen und für physiologische Bedingungen sorgen	43
Abbildung 3.12 3D-Hautkonstrukt (links) und Fluoreszenzbild (rechts) in 20 μm Tiefe (Stratum granulosum) angefärbt mit Rhodamin 6G	45
Abbildung 4.1 Fluoreszenzaufnahme eines Lymphknotens mit hell fluoreszierenden T-Zellen. Computergestützte Ortung erhöhter Fluoreszenzintensität in x-y-Richtung innerhalb einer Ebene (hier die Fluoreszenz von CFSE).....	49
Abbildung 4.2 FLIM-Aufnahme einer HDF-Zelle, die mit DBT8 angefärbt wurde. Die Skalierung gibt die Fluoreszenzlebensdauer in Pikosekunden wieder.	50
Abbildung 4.3 Erzeugen eines Parameter-Bildes aus einer Fluoreszenzlebensdauerabhängigkeit.....	51
Abbildung 4.4 Intensitätsbild der NAD(P)H-Fluoreszenz einer MIN6 β -Zelle	52
Abbildung 4.5 3D-Rendering aus 22 Einzelintensitätsbildern in 1 μm Abstand einer MIN6 β -Zelle	53
Abbildung 4.6 3D-Rendering einer MIN6 β -Zelle mit 60 Einzelintensitätsbildern	55
Abbildung 5.1 UV-VIS / Fluoreszenz Spektrum und Strukturformel des BCECF (Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein). Seit seiner Vorstellung ⁵⁸ in 1982, ist es ein weit verbreiteter pH-Indikator für intrazelluläre, biologische Anwendungen.....	58
Abbildung 5.2 Fluoreszenzlebensdauer des BCECF bei unterschiedlichen pH-Werten in wässriger Lösung.....	59
Abbildung 5.3 Molekülstruktur des Coumarin 314 (IUPAC-Name 1,2,4,5,3H,6H,10H-Tetrahydro-9-carbethoxy-[1]benzopyrano(9,9a,1-gH)-quinolizin-10-on)	60

Abbildung 5.4 : Gemessene Fluoreszenzlebensdauern von Coumarin 314 bei verschiedenen Viskositäten (oben) und pH-Werten (unten). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar.	61
Abbildung 5.5 FLIM-Aufnahme (links) in einer epidermalen Tiefe von 3,4 μm mit Coumarin 314. Das rechte Bild zeigt das entsprechende n -map mit dem Brechungsindex, hier sind deutliche Unterschiede im Brechungsindex innerhalb der Zelle (grün) und dem Interzellularraum (rot) zu erkennen.	63
Abbildung 5.6 Änderung des gemittelten Brechungsindex mit zunehmender epidermaler Tiefe in einem 3D-Hautkonstrukt berechnet über die Coumarin 314 Lebensdauer	64
Abbildung 5.7 pH-Bild in einem Hautkonstrukt in einer Tiefe von 13 μm (Zellen rot, Zellzwischenraum grün).....	64
Abbildung 5.8 Unterschiedliche pH-Werte in bestimmten epidermalen Tiefen beim inter- und intrazellulären Vergleich.....	65
Abbildung 6.1 Strukturformel des NADPH (Nicotin- und Adenosinrest in blau), aufgrund des ausgedehnten π -Elektronensystems ist eine Absorption in der Nähe des sichtbaren Bereiches zu erwarten	67
Abbildung 6.2 UV-VIS Spektrum des NADH in wässriger Lösung bei pH 7. Anregung bei 340 nm zeigt ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 465 nm (normiert). Das Coenzym NADPH verhält sich spektrophotometrisch gleich.	68
Abbildung 6.3 UV-VIS Spektren des FAD und NADH im Vergleich	69
Abbildung 6.4 Gerenderte FLIM-Bilder (a und b) einer β -Zelle in einer Pankreas-Insel. Bild c zeigt den prozentualen Fluoreszenzsignalanteil des proteingekoppelten NAD(P)H zum Gesamtfluoreszenzsignal. Das Intensitätsbild wie es von der Kamera registriert wird, ist unter d dargestellt.	71
Abbildung 6.5 freies und proteingekoppeltes NAD(P)H zeigen starke Fluoreszenzlebensdauerunterschiede, in diesem Fall handelt es sich um ein Histogramm der NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauern aus dermalen Fibroblasten. Das rote Histogramm zeigt die Verteilung des freien NAD(P)H, das die kürzere Lebensdauer aufweist.	72
Abbildung 6.6 Fluoreszenzintensitätsmessungen an MIN6 β -Zellen bei Umströmung mit Krebs-Ringer-Lösung verschiedener Glucosekonzentrationen. Start bei 0 mM (oben), Wechsel auf 20 mM (Mitte) und wieder auf 0 mM Glucosekonzentration. Skalierung in willkürlichen Intensitätseinheiten	74
Abbildung 6.7 Fluoreszenzintensitätsmessungen an einer zweiten Min6 β -Zelle. Gleiches Vorgehen, wie in Abbildung 6.6	75
Abbildung 6.8 Zeitlicher Intensitätsverlauf der NAD(P)H-Autofluoreszenz mit Glucosestimulation im Zellplasma (links) und im Zellkern (rechts) im Vergleich	76

- Abbildung 6.9 FLIM-Aufnahme einer MIN6 β -Zelle bei Umströmung mit glucosefreier Krebs-Ringer-Lösung. Bild a zeigt die proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer, Bild b die des freien NAD(P)H (beide Skalierungen in ps). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent. 78
- Abbildung 6.10 Fluoreszenzlebensdauerhistogramme aus proteingebundenen NAD(P)H-FLIM-Aufnahmen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten bei Umspülung mit glucosefreiem Medium (vgl. Bild a in Abbildung 6.9). Der Hauptanteil der NAD(P)H-Proteinkomplexe hat eine gemittelte Lebensdauer von $2,83 \pm 0,16$ ns. 79
- Abbildung 6.11 Histogramm über die örtliche Verteilung des Signalanteils der Fluoreszenz, das durch proteingebundenes NAD(P)H hervorgerufen wird. Messung bei Umströmung mit glucosefreier Krebs-Ringer-Lösung. Histogramm erzeugt aus Abbildung 6.9 c und in 5 Prozentschritte eingeteilt. 79
- Abbildung 6.12 FLIM-Aufnahme der MIN6 β -Zelle bei Wechsel auf eine 20 mM Glucosekonzentration. Bild a zeigt die proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer, Bild b die des freien NAD(P)H (beide Skalierungen in ps). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent und Bild d ein Intensitätsbild. . 80
- Abbildung 6.13 Fluoreszenzlebensdauerhistogramme aus proteingebundenen NAD(P)H-FLIM-Aufnahmen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten bei 20 mM Glucose. Der Hauptanteil der NAD(P)H-Proteinkomplexe hat eine gemittelte Lebensdauer von $2,89 \pm 0,11$ ns 81
- Abbildung 6.14 Histogramm über die örtliche Verteilung des Signalanteils der Fluoreszenz, das durch proteingebundenes NAD(P)H hervorgerufen wird. Messung bei Umströmung mit Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucose. 81
- Abbildung 6.15 Änderung des Signalanteils an gekoppeltem NAD(P)H. Bei Anstieg von 0 auf 20 mM Glucose werden mehr NAD(P)H-Moleküle gekoppelt. Die Wertebereiche wurden auf 1 normiert. 82
- Abbildung 6.16 FLIM-Aufnahme einer MIN6 β -Zelle bei Umströmung mit einer Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucose. Gleiches Verfahren wie in Abbildung 6.9 und Abbildung 6.12. Proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer in ps (Bild a) und freies NAD(P)H (Bild b). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent..... 83
- Abbildung 6.17 Fluoreszenzlebensdauerhistogramme aus proteingebundenen NAD(P)H-FLIM-Aufnahmen zu je fünf verschiedenen Zeitpunkten bei 20 mM und 0 mM Glucose. Der Hauptanteil der NAD(P)H-Proteinkomplexe hat eine gemittelte Lebensdauer bei $2,97 \pm 0,15$ ns für das freie und $2,97 \pm 0,13$ ns für das proteingebundene NAD(P)H 83
- Abbildung 6.18 FLIM-Aufnahme einer MIN6 β -Zelle bei Umströmung mit glucosefreier Krebs-Ringer-Lösung. Proteingekoppelte NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer in ps (Bild a) und freies NAD(P)H (Bild b). Bild c zeigt den Anteil an gebundenem NAD(P)H in Prozent.. 84

Abbildung 6.19 Änderung des Signalanteils an gekoppeltem NAD(P)H. Bei Rückgang der Glucosekonzentration von 20 auf 0 mM, werden analog zu ersten Messungen weniger NAD(P)H-Moleküle gekoppelt.....	85
Abbildung 7.1 UV-VIS-Spektrum und Strukturformel des Adenosintriphosphats.....	88
Abbildung 7.2 Fluoreszenzlebensdauer des ATP nach Dreiphotonenanregung. Sie beträgt 439 ± 55 ps	89
Abbildung 7.3 Aufbau für eine Zwei-Farben Zwei-Photonen Überlagerung mit Femtosekundenpulsen.....	90
Abbildung 7.4 Fluoreszenz des ATP bei Anregung mit 3 unterschiedlichen Wellenlängen. Unerwartet tritt die stärkste Fluoreszenz bei ca. 290 nm auf.....	92

Literaturverzeichnis

- ¹ Michael Kröner, *Chromophore für die Zweiphotonenabsorption*, Dissertation, (2005), <http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00001558>, 31ff
- ² Adam, Läger, Stark, *Physikalische Chemie und Biophysik*, 4. Auflage, Springer, Berlin (2003), 1
- ³ R. Niesner, K.-H. Gericke, *Quantitative determination of the single-molecule detection regime in fluorescence fluctuation microscopy by means of photon counting histogram analysis*, Journal of Chemical Physics (2006), 124(13)
- ⁴ M. Edetsberger, E. Gaubitzer, E. Valic, E. Waigmann, G. Koehler, *Detection of nanometer-sized particles in living cells using modern fluorescence fluctuation methods*, Biochemical and Biophysical Research Communications (2005), 332(1), 109-116.
- ⁵ R. M. Williams, D. W. Piston, W. W. Webb, *Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry*, The FASEB journal, (1994), 8(11), 804-13
- ⁶ B.R. Master, P.T.C. So, E. Gratton, *Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin*, Biophys. J., 72, (1997), 2405-2412
- ⁷ J.R. Lakowicz, K. Berndt, *Lifetime-selective fluorescence imaging using an rf phase-sensitive camera*, Rev. Sci. Instrum., 62, (1991), 1727-1734
- ⁸ Denk, W.; Strickler, J.H.; Webb, W.W.; *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*, Science, 248, (1990), 73 – 76
- ⁹ Brakenhoff GJ, Squier J, Norris T, Bliton AC, Wade WH, Athey B.; *Real-time two-photon confocal microscopy using a femtosecond, amplified Ti:Sapphire system*, J. Microsc. (1996), 181:253–59
- ¹⁰ Kim KH, Buehler C, So PTC.; *Highspeed, two-photon scanning microscope*, Appl. Opt. (1999), 38:6004–9
- ¹¹ Campagnola PJ, Wei M-D, Lewis A, Loew LM.; *High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation*. Biophys. J. (1999), 77:3341–49
- ¹² Van Orden A, Cai H, Goodwin PM, Keller RA.; *Efficient detection of single DNA fragments in flowing sample streams by two-photon fluorescence excitation*. Anal. Chem. (1999), 71:2108–16

- ¹³ Parasassi T, Gratton E, Zajicek H, Levi M, Yu W.; *Detecting membrane lipid microdomains by two-photon fluorescence microscopy*, IEEE Eng. Med. Biol. Mag. (1999), 18:92–99
- ¹⁴ Agronskaia AV, Tertoolen L, Gerritsen HC; *Fast fluorescence lifetime imaging of calcium in living cells*, J Biomed Opt. (2004) Nov-Dec;9(6):1230-7
- ¹⁵ Lakowicz, J.R.; Szmajcinski, H.; Nowaczyk, K.; Johnson, M.; *Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, (1992), 1271 – 1275
- ¹⁶ Pawley, J.B.; *Handbook of biological confocal microscopy*, Plenum Press, New York, (1995), 491 – 451
- ¹⁷ Ca, J.B.; *Handbook of biological confocal microscopy*, Plenum Press, New York, (1995), 491 – 451
- ¹⁸ Gratton, E.; *Handbook of biological confocal microscopy*, Biophysical Journal, (2002), 491 – 451
- ¹⁹ B. Peker, *Visualisierte Zweiphotonenrastermikroskopie zur Aufklärung von biologischen Transportprozessen*, Diplomarbeit, (2002)
- ²⁰ Raluca Niesner, Bülent Peker, Peter Schlüsche, and Karl-Heinz Gericke, *Noniterative Biexponential Fluorescence Lifetime Imaging in the Investigation of Cellular Metabolism by Means of NAD(P)H Autofluorescence*, Chemphyschem. (2004) Aug 20; 5(8), 1141-9.
- ²¹ *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 259., neu bearb. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin (2002), 1395
- ²² *LEXIKON DER OPTIK*, Verlag Werner Dausien, Hanau, (1988), 266
- ²³ J. Eichler, *Laser Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*, 4. Auflage, Springer, Berlin (2002), 148f
- ²⁴ G. A. Reider, *Photonik Eine Einführung in die Grundlagen*, Springer, Wien, (2005), 273ff
- ²⁵ Göppert-Mayer, M., *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*, Ann. Phys. (1931) 9, 273-295.
- ²⁶ J. Michael Hollas, *High Resolution Spectroscopy*, Butterworth, London, (1982), 10ff, 558f
- ²⁷ Molecular Probes, *The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Tenth Web Edition, Stand: 22. Juni (2006)
<http://probes.invitrogen.com/servlets/photo?fileid=g002088&company=probes>
- ²⁸ R. R. Birge, *Two-photon spectroscopy of protein-bound chromophores*, Accounts of Chemical Research (1986), 19(5), 138-46.

- ²⁹ Volkmer A and Birch D J S, *Multi-photon fluorescence spectroscopy of saturated hydrocarbons*, 5th Int. Conf. on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy (Berlin, Germany, 21–24 September **1997**)
- ³⁰ Andreas Volkmer, David A Hatricky and David J S Birch, *Time-resolved nonlinear fluorescence spectroscopy using femtosecond multiphoton excitation and single-photon timing detection*, Meas. Sci. Technol. 8 (**1997**), 1339–1349.
- ³¹ Robert R. Birge, *Two-Photon Spectroscopy of Protein-Bound Chromophores*, Acc. Chem. Res. (**1986**), 19, 138-146
- ³² McClain, W. M. *Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids*. Journal of Chemical Physics (**1971**), 55(6), 2789-96
- ³³ DRAAIJER, A.; SANDERS, R.; GERRITSEN, H.C. Fluorescence Lifetime Imaging, a New Tool in Confocal Microscopy, *Handbook of biological confocal microscopy*, J. Pawley, Plenum Press, New York, (**1995**), 491-505
- ³⁴ Lakowicz, Joseph R.; Szmajda, Henryk; Nowaczyk, Kazimierz; Berndt, Klaus W.; Johnson, Michael. *Fluorescence lifetime imaging*. Analytical Biochemistry (**1992**), 202(2), 316-30
- ³⁵ Sanders, Renata; Draaijer, Arie; Gerritsen, Hans C.; Houpt, Piet M.; Levine, Yehudi K. *Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy*. Analytical Biochemistry (**1995**), 227(2), 302-8.
- ³⁶ Bambot, Shabbir B.; Rao, Govind; Romauld M., M.; Carter, Gary M.; Sipior, Jeffrey; Terpetchnig, Ewald; Lakowicz, Joseph R. *Sensing oxygen through skin using a red diode laser and fluorescence lifetimes*. Biosensors & Bioelectronics (**1995**), 10(6/7), 643-52
- ³⁷ H.-H. Schmidtke, H. Kupka und R. Wernicke, *Die vibronische Kopplung in Koordinationsverbindungen am Beispiel von Hexahalogenokomplexen*, Fresenius Z. Anal. Chem. 304, (**1980**), 290
- ³⁸ Richard P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Ninth Edition, (**2002**)
- ³⁹ K. König, P. T. C. So, W. W. Mantulin, and E. Gratton, *Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes*, Opt. Lett. 22, (**1997**), 135-136.
- ⁴⁰ J. Squier, M. Müller, *High resolution microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging*, Review of Scientific Instruments, Volume 72, Issue 7, July (**2001**), pp.2855-2867
- ⁴¹ mündliche Mitteilung: Improvisation Deutschland Entwicklerteam von Volocity®

- ⁴² DRAAIJER, A.; SANDERS, R.; GERRITSEN, H.C. *Fluorescence Lifetime Imaging, a New Tool in Confocal Microscopy, Handbook of biological confocal microscopy*, J. Pawley, Plenum Press, New York, (1995), 491-505.
- ⁴³ Gratton Enrico; Breusegem Sophie; Sutin Jason; Ruan Qiaoqiao; Barry Nicholas *Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods*. Journal of biomedical optics (2003), 8(3), 381-90
- ⁴⁴ Nielsen T; Fricke M; Hellweg D; Andresen P *High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy*. Journal of microscopy (2001), 201(Pt 3), 368-76.
- ⁴⁵ G. Löffler, P. E. Petrides, *Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation*. (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, (1997), Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 787-811
- ⁴⁶ Miyazaki J; Araki K; Yamato E; Ikegami H; Asano T; Shibasaki Y; Oka Y; Yamamura K, *Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms*, Endocrinology (1990), 127(1), 126-32
- ⁴⁷ Cornelia Kasper, *Tissue Engineering - Ersatzteillager Mensch?*, Chemie in unserer Zeit, (2005), 39, 394 – 401
- ⁴⁸ Eckert, H.-G.; Weimer, M.; *Dreidimensionale Zellstrukturen für die Hauttransplantation*, (2002), Internetveröffentlichung unter:
www.igb.fhg.de/WWW/GF/Organersatz/dt/GFOE_23_Hauttranspl.dt.html (18.09.2003)
- ⁴⁹ Winkler, A.; Müller-Goymann, C.C., *Comparative permeation studies of deltaaminolevulinic acid and its n-butylester through stratum corneum and artificial skin constructs*, Eur. J. Pharm. Biopharm.; 53, (2002), 281-287.
- ⁵⁰ Johnson L V; Walsh M L; Chen L B *Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1980), 77(2), 990-4.
- ⁵¹ Schneckenburger Herbert; Stock Karl; Lyttke Marco; Strauss Wolfgang S L; Sailer Reinhard *Fluorescence lifetime imaging (FLIM) of rhodamine 123 in living cells*. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology (2004), 3(1), 127-31
- ⁵² Liu, Dacheng; Yu, Jie; Chen, Huiyuan; Reichman, Richard; Wu, Hulin; Jin, Xia. *Statistical determination of threshold for cellular division in the CFSE-labeling assay*. Journal of Immunological Methods (2006), 312(1-2), 126-136.

- ⁵³ Szmecinski H; Lakowicz J R *Possibility of simultaneously measuring low and high calcium concentrations using Fura-2 and lifetime-based sensing*. Cell calcium (1995), 18(1), 64-75
- ⁵⁴ Ryder, Alan G.; Power, Sarah; Glynn, Thomas J.; Morrison, John J. *Time-domain measurement of fluorescence lifetime variation with pH*. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering (2001), 4259 (Biomarkers and Biological Spectra Imaging), 102-109
- ⁵⁵ Dikstein S; Zlotogorski A *Measurement of skin pH*. Acta dermato-venereologica. Supplementum (1994), 185 18-20.
- ⁵⁶ Ohman H; Vahlquist A *In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis*. Acta dermato-venereologica (1994), 74(5), 375-9
- ⁵⁷ Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Presseinformation, 24. Oktober (2005), Stuttgart
- ⁵⁸ Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T, *Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes*, J Cell Biol. (1982) Oct;95(1), 189-96
- ⁵⁹ Richard P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Ninth Edition, 831f
- ⁶⁰ Hanson, K. M.; Behne, M. J.; Barry, N. P.; Mauro, T. M.; Gratton, E.; Clegg, R. M., *Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient*, Biophys. J. (2002), 83, 1682-1690
- ⁶¹ Weast, R. C.; Astle, M. J.; *CRC Handbook of Chemistry and Physics 1980-1981*, 61. Aufl., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1981)
- ⁶² Askari, Janet A.; Humphries, Martin J.; *Cell - matrix interactions*, Encyclopedia of Biological Chemistry (2004), 1 362-366.
- ⁶³ Kuz'minykh, E. V.; Petrov, Yu. P.; *A simple model for the study of effects of the extracellular matrix on the cell morphology in vitro*, Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects (2004), 1671(1-3), 18-25.
- ⁶⁴ Lubert Stryer, *Biochemie*, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, (1996), 467ff
- ⁶⁵ Chance, Britton; Thorell, Bo. *Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry*. Journal of Biological Chemistry (1959), 234 3044-50
- ⁶⁶ Chance, Britton; Legallais, Victor. *Differential microfluorimeter for the localization of reduced pyridine nucleotide in living cells*. Review of Scientific Instruments (1959), 30 732-5.

- ⁶⁷ *Concise Encyclopedia of Biochemistry*, Walter de Gruyter Berlin (1983), 297f
- ⁶⁸ Rounds, D. E.; Olson, R. S.; Johnson, F. M. *Two - photon absorption in reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)*. U. S. At. Energy Comm. (1966), (CONF-661127), 158-9.
- ⁶⁹ Kierdaszuk B; Malak H; Gryczynski I; Callis P; Lakowicz J R *Fluorescence of reduced nicotinamides using one- and two - photon excitation*. Biophysical chemistry (1996), 62(1-3), 1-13.
- ⁷⁰ S. Huang, A., A. Heikal, W. W. Webb; *Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein*, Biophysical Journal Vol. 82 (2002), 2811–2825
- ⁷¹ Aubin J E *Autofluorescence of viable cultured mammalian cells*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society (1979), 27(1), 36-43.
- ⁷² M. R. Kasimova, K. Krab, J. Grigienė, P. E. Andersen, P. Hagedorn, H. K. Flyvbjerg, I. M. Møller; *Quantitative distinction between bound and free NADH in biological systems*, Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering (2004), 5322 (Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues II), 42-51
- ⁷³ J. Vigo; S. Lahmy; J M Salmon; P. Viallet, *Fluorescence decay curves under pulsed excitation: distinction between free and bound NAD(P)H on isolated living cells*, Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie III, Sciences de la vie, (1984), 299(12), 489-94.
- ⁷⁴ M. E. Tischler, D. Friedrichs, K. Coll, J. R. Williamson; *Pyridine nucleotide distributions and enzyme mass action ratios in hepatocytes from fed and starved rats*, Archives of Biochemistry and Biophysics, (1977), 184(1), 222-36.
- ⁷⁵ Salmon, Jean Marie; Kohen, Elli; Viallet, Pierre; Hirschberg, Joseph G.; Wouters, Alain W.; Kohen, Cahide; Thorell, Bo. *Microspectrofluorometric approach to the study of free/bound NAD(P)H ratio as metabolic indicator in various cell types*, Photochemistry and Photobiology (1982), 36(5), 585-93
- ⁷⁶ Koehler, Martin; Nyqvist, Daniel; Moede, Tilo; Wahlstedt, Helene; Cabrera, Over; Leibiger, Ingo; Berggren, Per-Olof. *Imaging of pancreatic beta-cell signal-transduction*. Current Medicinal Chemistry: Immunology, Endocrine & Metabolic Agents (2004), 4(4), 281-299.
- ⁷⁷ Evans N. D., Gnudi L, Rolinski O. J., Birch D. J., Pickup J. C. *Glucose-dependent changes in NAD(P)H-related fluorescence lifetime of adipocytes and fibroblasts in vitro: potential for non-invasive glucose sensing in diabetes mellitus*. J Photochem Photobiol B. (2005) Aug 1; 80(2):122-9.

- ⁷⁸ Blinova, Ksenia; Carroll, Stefanie; Bose, Salil; Smirnov, Aleksandr V.; Harvey, John J.; Knutson, Jay R.; Balaban, Robert S. *Distribution of Mitochondrial NADH Fluorescence Lifetimes: Steady-State Kinetics of Matrix NADH Interactions*. *Biochemistry* (2005), 44(7), 2585-2594
- ⁷⁹ B.D. Bennett, T.L. Jetton, G. Ying, M.A. Magnuson and D.W. Piston, *Quantitative Subcellular Imaging of Glucose Metabolism within Intact Pancreatic Islets*, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 271 (1996), 3647-3651
- ⁸⁰ G. H. Patterson, S. M. Knobel, P. Arkhammar, O. Thastrup, and D. W. Piston, *Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2000); 97(10), 5203-7
- ⁸¹ Dukes, Iain D.; McIntyre, Margaret S.; Mertz, Robert J.; Philipson, Louis H.; Roe, Michael W.; Spencer, Ben; Worley, Jennings F., III. *Dependence on NADH produced during glycolysis for β -cell glucose signaling*, *Journal of Biological Chemistry*, (1994), 269(15), 10979-82.
- ⁸² Koenig, K.; So, P. T. C.; Mantulin, W. W.; Tromberg, B. J.; Gratton, E. *Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress*. *Journal of Microscopy* (Oxford) (1996), 183(3), 197-204
- ⁸³ R. Niesner, *New advancements in highly sensitive time-resolved fluorescence two-photon microscopy : Theoretical approaches and bioscientific applications*, Dissertation (2005)
URL: <http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00001704>, 115ff
- ⁸⁴ M. W. Dowley, K. B. Eisenthal and W. L. Peticolas, *Two-Photon laser excitation of polycyclic aromatic molecules*, *J. Chem. Phys.* (1967), 47, 1609-1619
- ⁸⁵ Monson, P. R.; McClain, W. M. *Polarization dependence of the two-photon absorption of tumbling molecules with application to liquid 1-chloronaphthalene and benzene*, *Journal of Chemical Physics*, (1970), 53(1), 29-37.
- ⁸⁶ Monson, P. R.; McClain, W. M. *Complete polarization study of the two-photon absorption of liquid 1-chloronaphthalene*, *Journal of Chemical Physics* (1972), 56(10), 4817-25.
- ⁸⁷ D. Froehlich, H. Mahr, *Two-photon spectroscopy in anthracene*, *Physical Review Letters* (1966), 16(20), 895-7.
- ⁸⁸ McClain, W. M. *Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids*, *Journal of Chemical Physics* (1971), 55(6)
- ⁸⁹ McClain, W. Martin. *Two-photon molecular spectroscopy*, *Accounts of Chemical Research* (1974), 7(5), 129-35
- ⁹⁰ Gryczynski, I., Malak, H. and Lakowicz, J.R, *Two-Color Two-Photon Excitation of Indole*, *Biospectroscopy*, (1997) 3(2):97-101.

- ⁹¹ Cambaliza, M. O.; Saloma, C., *Advantages of two-color excitation fluorescence microscopy with two confocal excitation beams*, Optics Communications (**2000**), 184(1-4), 25-35
- ⁹² Y. Kanekiyo, R. Naganawa, H. Tao, *Fluorescence detection of ATP based on the ATP-mediated aggregation of pyrene-appended boronic acid on a polycation*, Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom) (**2004**), (8), 1006-1007.
- ⁹³ Helga Hummel, Volker Weiler, *Targeted agents for molecular imaging*, PCT Int. Appl. (**2006**), 22 pp
- ⁹⁴ Chang, Sung K.; Errabelli, Divya; Rizvi, Imran; Solban, Nicolas; O'Riordan, Katherine; Hasan, Tayyaba. *Molecular imaging of photodynamic therapy*, Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering, (**2006**), 6097(Optical Molecular Probes for Biomedical Applications), 609701/1-609701/7
- ⁹⁵ Mulder, Willem J. M.; Strijkers, Gustav J.; Habets, Jo W.; Bleeker, Egbert J. W.; van der Schaft, Daisy W. J.; Storm, Gert; Koning, Gerben A.; Griffioen, Arjan W.; Nicolay, Klaas. *MR molecular imaging and fluorescence microscopy for identification of activated tumor endothelium using a bimodal lipidic nanoparticle*, FASEB Journal, (**2005**), 19(14), 2008-2010.